Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia

Dissertação de mestrado

Ensaios de Duplo-Híbrido e *Pull-down* no estudo de interações moleculares da Beta-1,3-glicanosiltransferase 3 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Candidata: Mirelle Garcia Silva
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Goiânia-GO
Janeiro - 2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Ensaios de Duplo-Híbrido e *Pull-down* no estudo de interações moleculares da Beta-1,3-glicanosiltransferse 3 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Goiânia – GO

Janeiro – 2010

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Mirelle Garcia Silva				
E-mail:	mirellegarcias@gmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [X]Sim [ ] Não					
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:				Sigla:	
País:		UF:		CNPJ:	
Título:	Ensaios de Duplo-Híbrido e *Pull-down* no estudo de interações moleculares da Beta-1,3-glicanosiltransferse 3 de *Paracoccidioides brasiliensis*				
Palavras-chave:	Parede celular, glicanosiltransferase, interações proteína-proteína				
Título em outra língua:	Two-hybrid and Pull-Down assays in the study of molecular interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* Beta-1,3-glucanosyltransferase 3				
Palavras-chave em outra língua:	Cell wall, glucanosyltransferase, protein-protein interactions				
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/01/2010				
Programa de Pós-Graduação:	Biologia				
Orientador (a):	Prof^{a}. Dr^{a}. Célia Maria de Almeida Soares				
E-mail:	celia@icb.ufg.br				
Co-orientador (a):					
E-mail:					

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] [X] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Mirelle Garcia Silva
_____ Data: 26 / 02 / 2010
Assinatura do (a) autor (a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

Ensaios de Duplo-Híbrido e *Pull-down* no estudo de interações moleculares da Beta-1,3-glicanosiltransferse 3 de *Paracoccidioides brasiliensis*

Candidata: Mirelle Garcia Silva

Orientadora: Profa. Dra.Célia Maria de Almeida Soares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituo de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia.

Goiânia – GO
Janeiro – 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

Silva, Mirelle Garcia.
S586e Ensaios de duplo-híbrido e *Pull-down* no estudo de interações moleculares da Beta-1,3-glicanosiltransferase 3 de *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Mirelle Garcia Silva. - 2010.
xv, 81 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Célia Maria de Almeida Soares
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de abreviaturas.

1. Parede celular 2. Glicanosiltransferase 3. Proteína – proteína – interações. I. Título.

CDU: 582.28

DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

APOIO FINANCEIRO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás (FAPEG), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás (SECTEC-GO).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília

Prof. Dr. André Kipnis

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

SUPLENTES

Profa. Dra. Silvia Maria Salem Izacc

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Dra. Luciane Madureira de Almeida

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

"O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior."

Albert Einstein

Sabedoria é a arte de degustar. Sobre a sabedoria Nietzsche diz o seguinte: "A palavra grega que designa o sábio se prende, etimologicamente, a sapio*, eu saboreio,* sapiens*, o degustador,* sisyphus*, o homem do gosto mais apurado". A sabedoria é, assim, a arte de degustar, distinguir, discernir. O homem do saberes, diante da multiplicidade, "precipita-se sobre tudo o que é possível saber, na cega avidez de querer conhecer a qualquer preço". Mas o sábio está à procura das "coisas dignas de serem conhecidas". Imagine um bufê: sobre a mesa enorme da multiplicidade, uma infinidade de pratos. O homem dos saberes, fascinado pelos pratos, se atira sobre eles: quer comer tudo. O sábio, ao contrário, para e pergunta ao seu corpo: "De toda essa multiplicidade, qual é o prato que vai lhe dar prazer e alegria?" E assim, depois de meditar, escolhe um...*

Rubem Alves

Dedido este trabalho às pessoas mais importante da minha vida...

...aos meus pais José e Lucelha...

...que, incansavelmente, lutaram e ainda o fazem no intuito de sempre oferecer às suas filhas as condições necessárias para viver com dignidade, pessoal e profissionalmente...

...que sempre me ensinaram que os bons frutos são resultados de muito trabalho, perseverança, paciência e honestidade...

...que sempre me deram bons coselhos acompanhados de ótimos exemplos...

...que me ensinaram que o sentido da vida está em amar e respeitar o próximo como a nós mesmos e que a felicidade é a imediata conseqüência desses atos.

Agradeço pela dedicação e amor incondicionais... Vocês são e sempre serão os meus anjos, os meus guias...

...à minha irmã Marielle...

...que sempre me apoiou e me desejou o melhor...

...obrigada pelo carinho, pela atenção, pelo cuidado e paciência...

Tudo o que conquistei até aqui foi fruto do amor e apoio incondicional de vocês!

À todos o meu amor e eterna gratidão!

Muito obrigada!

*Aos meus avós João e Coraci (*in memorian*), os dois maiores exemplos de que trabalho e humildade são sinônimos de conquista. Obrigada pelo cuidado e dedicação. Sei que ainda estão orando e zelando por mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço Àquele que meu deu a vida... à Deus sou grata por mais uma oportunidade, pela energia, por me guiar pelo caminho certo e pela força que não permitiu que eu desiste frente aos mais difíceis obstáculos.

Um agradecimento especial e sincero à minha orientadora Célia, por sua postura, dedicação e profissionalismo. Célia, seu empenho e compromisso com o que faz a tornaram um exemplo como pesquisadora. Mesmo com todas as dificuldades impostas ao meio científico você sempre trabalhou para conseguir as condições mais favoráveis ao desenvolvimento de seus alunos. Isso é visto pela qualidade dos trabalhos desenvolvidos e pelo perfil dos profissionais que são formados sob sua orientação. Sua seriedade e preocupação diante do uso do bem público demonstram o verdadeio profissionalismo. Por isso tudo e por sua competência inquestionável, eu a admiro muito. Sou grata e honrada por ter sido sua aluna na iniciação científica e no mestrado. As experiências adquiridas durante todos esses anos foram e ainda serão muito importantes ao longo do meu futuro profissional e pessoal. Agradeço pela oportunidade, pela confiança em mim depositada e pela paciência. Você sempre terá o meu respeito e a minha admiração.

Agradeço de forma especial minha grande amiga Elisa Flávia. Elisa, admiro muito sua postura no grupo de trabalho e sua dedicação e compromisso com o que faz. Seu companheirismo e presença constantes foram essenciais para transformar momentos difíceis em experiências enriquecedoras. Obrigada pelo sorriso quando me senti triste, pelas palavras carinhosas quando o silêncio parecia ser a solução, pelo abraço aconchegante quando o cansaço me abatia e por tudo que só um amigo de verdade pode oferecer.

Agradeço de forma muito especial e sincera o meu namorado Alexandre, a pessoa mais especial que já conheci. Admiro sua postura diante do trabalho, sua dedicação, compromisso e responsabilidade com tudo o que faz. Admiro também sua postura diante da vida, diantes dos homens, a bondade que traz no coração, o respeito pelo próximo e a disponibilidade para ajudar qualquer pessoa, indistintamente. Agradeço pela presença constante e ajuda nunca negada. Nos momentos mais difíceis suas palavras e seu carinho tornavam qualquer problema infinitamente pequeno diante da força e confiança que você me transmitia. Obrigada por ser mais que um namorado, por ser um companheiro, um amigo. Sua

presença foi muito importante durante a execução deste trabalho. E é por tudo isso e por muito mais, que amo você!

Ao Clayton e à Juliana, meus "pais científicos", que me ampararam nos primeiros passos no LBM e sempre estiveram dispostos a me ensinar. Suas explicações e sábios conselhos proporcionaram uma visão além dos experimentos de bancada. Obrigada por serem amigos tão especiais!

À amiga Patrícia Lima pelo companheirismo de todas as horas. Sua ajuda foi muito importante para a finalização de mais etapa. Agradeço pela ótima convivência e por tornar mais agradáveis e descontraídos os árduos dias de trabalho. Admiro muito sua postura e compromisso no trabalho. Com certeza, terá muito sucesso no seu futuro profissional. Aprendi muito com você!

À Ana Flávia pela ótima convivência e pelo auxílio na interpretação dos dados de espectrometria de massas.

Ao amigo Rodrigo pela boa convivência, momentos divertidos e conversas agradáveis.

À minha amiga Daniele que, mesmo de longe, sempre me apoiou e acreditou que eu seria capaz.

Ao Wesley pelos momentos de aprendizado e de diversão. Admiro muito sua garra e postura como profissional.

À Mariana pela "presença" e por ser minha companheira de quarto durante os congressos.

A todos os órgãos de fomento à pesquisa (CNPq, FINEP, FAPEG, SECTEC-GO), principalmente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Às professoras Maristela Pereira e Silvia Salém-Izacc pela colaboração e boa convivência.

Aos professores Augusto Schrank e Marilene Vainstein pela disponibilidade em me receber no Centro de Biotecnologia da UFRGS, e ao Charley e a Lívia, por terem me acompanhado durante a estadia no laboratório. Agradeço também à Juliana Crestani e à Luciana pela ótima convivência no laboratório, pelas longas conversas e por me acompanhar nos passeios em Porto Alegre.

Aos professores Augusto Shrank e Silvia Salém-Izacc pelas colocações e sugestões dadas durante a apresentação do projeto ao Programa de Pós-Graduação.

Ao professor Cirano e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFG por terem contribuído para a minha formação.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuição: Bergmann Morais, André Kipnis, Silvia Salem-Izaac e Luciane Almeida.

À professora Ligia Miranda e sua aluna Carla Cristina da Escola de Veterinária da UFG, pela disponibilidade em me receber no laboratório para uso do sonicador.

Aos queridos colegas do LBM: Kelly, Simone Weber, Sarah, Tereza Cristina, Sabrina, Luiz Augusto, Ronney, Leandro, Daiane, Hellen, Keila, Luciane, Daciene, Marco Túlio, Nathalie, Edilânia, Nadya, Ademar, Elvis e Sheyla.

Ao Daniel Xavier, Kebler, Romeu e Daniel pelo apoio na Bioinformática.

Aos colegas do grupo da Maristela: Renata, Neto, Patrícia Kott, Raquel, Patrícia Zambuzzi, Amanda, Karine e Simone.

A dona Dora e todas as funcionárias que trabalham na limpeza do laboratório. Obrigada pelo cuidado e zelo.

A minha família pelo apoio incondicional e incentivo.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 - *Paracoccidioides brasiliensis*: aspectos gerais	16
1.2 - Paracoccidioidomicose	20
1.3 - Parede celular de fungos	21
1.3.1 - Beta-1,3-glicanosiltransferases	24
1.4 - Parede celular de *P. brasiliensis*	29
1.5 - Dinâmica da parede celular	32
1.6 - Interações proteína-proteína	33
2 - JUSTIFICATIVA	38
3 - OBJETIVO GERAL	39
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 - Fluxograma	40
4.2 - Isolado do fungo e condições de cultivo	40
4.3 - Rastreamento de interações protéicas através do sistema de duplo-híbrido	40
4.3.1 - Análise das interações positivas	42
4.4 - Ensaios de coimunoprecipitação *in vitro*	42
4.5 - Análise de interações protéicas através do ensaio de *pull-down* GST	44
4.5.1 - Preparação do extrato de proteínas de *P. brasiliensis*	44

4.5.2 - Expressão heteróloga e solubilização de *Pb*Gel3p..... 44

4.5.3 - Ligação da *Pb*Gel3p-GST e GST à resina de glutationa..... 45

4.5.4 - Ensaio de *pull-down* com *Pb*Gel3p fusionada à GST..... 45

4.5.5 - Digestão tríptica e análise de peptídeos por espectrometria de massas..... 46

5 - RESULTADOS..... 48

5.1 - Rastreamento de interações protéicas através do ensaio de duplo-híbrido..... 48

5.2 - Confirmação das interações rastreadas por meio de reação de coimunoprecipitação..... 49

5.3 - Busca de interações através do ensaio de *pull-down* GST *in vitro*..... 50

6 - DISCUSSÃO..... 53

7 - CONCLUSÕES..... 64

8 - PERSPECTIVAS..... 65

9 - BIBLIOGRAFIA..... 66

10 - ANEXOS..... 81

10.1 - Apresentação do trabalho em congressos..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS

AD – domínio de ativação da transcrição

ade2 – gene codificante para enzima envolvida na biossíntese de adenina

Ala – alanina

Asp – asparagina

ATP – adenosina trifosfato

BD – domínio de ligação ao DNA

CBM43 – módulo de ligação a carboidrato, família 43

cDNA – DNA complementar

c-Myc – fator de transcrição contendo o domínio zíper de leucina

cnaA – gene codificante para calcineurina

crzA – gente codificante para o fator de transcrição que é defosforilado pela calcineurina

Ctf1B – fator de transcrição da cutinase

Cys-box – domínio rico em cisteína

DBP – família das proteínas que contêm o motivo DEAD

Dbp5p – proteína que contém o motivo DEAD 5

DEAD – motivo que contém os aminoácidos asp/glu/ala/asp

dis1 – mutantes deficientes na dissociação das cromátides irmãs

DNA – ácido desoxirribonucléico

dsk1 – gene codificante para a proteína quinase que suprime o fenótipo de dis1

EPD – essencial para o desenvolvimento de pseudohifa

Gal4p – fator de transcrição eucariótico

GAS – glicofosfolipídeo ancorado à superfície

GEL – beta-1,3-glicanosiltransferase (glicanosiltransferase alongando glicana)

GH72 – família 72 de glicosil-hidrolases

GlcNAc – N-acetilglicosamina

Glu – glutamina

GPI – glicosilfosfatidilinositol

GSH – glutationa

GST – glutationa S-transferase

GTP – guanosina trifosfato

HA – hemaglutinina

his3 – gene codificante para imidazol glicerolfosfato desidratase (via de biossítense da histidina)

HSP – proteína de choque térmico

HSP70 – proteína de choque térmico de 70 kDa

ITS – seqüência espaçadora interna

its3 – gene codificante para Pip5kp em *Schizosaccharomyces pombe*

leu2 – gene codificante para β-isopropilmalato desidrogenase (via de biossítense da leucina)

Mb – megabases

mel1 – gene codificante para a enzima α-galactosidase

mss4 – gene codificante para Pip5kp em *Saccharomyces cerevisiae*

Nab2p – proteína de ligação ao RNA nuclear poliadenilado 2

Npl3p – proteína de localização nuclear 3

*Pb*Gel3p – proteína Gel3 de *P.brasiliensis*

PBS – tampão fosfato salina

PCM – paracoccidioidomicose

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFGE – eletroforese em gel de campo pulsado

PHR – pH-regulado

PIP_2 – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

Pip5kp – fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase

Pmd1p – proteína de resistência a leptomicina B

pré-RNAm – RNAm não processado

Rat1p – proteína envolvida do tráfico de ácido ribonoucléico

rDNA – DNA ribossomal

RE – retículo endoplasmático

RNA – ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

rRNA – RNA ribossomal

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

Sky1p – quinase que fosforila repetições SR em levedura

SR – repetições serina/arginina

trp1 – gene codificante para N-(5'-fosforibosil)- antranilato isomerase (via de biossíntese do triptofano)

Tsa1p – proteína semelhante a oxidante específica de tiol

UDP – uridina difosfato

X-α-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-galactopiranosídeo

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termodimórfico, causador da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica prevalente na América do Sul. A infecção em humanos inicia-se com a inalação de propágulos fúngicos que atingem o epitélio pulmonar. A parede celular desempenha um papel importante na patobiologia do *P. brasiliensis*, pois está envolvida nas mudanças morfogenéticas associadas com o ciclo de vida deste patógeno. A biossíntese e o remodelamento dos polissacarídeos da parede celular são essenciais para o crescimento do fungo e proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI)-ancoradas estão envolvidas nesses processos. As enzimas da família glicanosiltransferase alongando glicana (GEL) são proteínas GPI-ancoradas que possuem atividade de beta-1,3-glicanosiltransferase e desempenham um importante papel nas ligações cruzadas dos componentes da parede celular em fungos. O genoma de *P. brasiliensis* possui 3 genes codificantes para beta-1,3-glicanosiltransferases (Gel1p, Gel2p e Gel3p). Com o objetivo de se buscar outras possíveis funções da beta-1,3-glicanosiltransferase 3 (*Pb*Gel3p) em *P. brasiliensis,* as interações entre essa proteína e outras proteínas do fungo foram investigadas através do sistema de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae* e do ensaio de *pull-down*. O sistema duplo-híbrido permite o estudo das interações *in vivo* e, através dele, foram identificadas 8 proteínas que interagem com *Pb*Gel3p. A interação com a fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase its3 e com a Dsk1 proteína quinase sugere a participação de *Pb*Gel3p no ciclo de divisão celular. A RNA helicase Dbp5p, cuja interação com *Pb*Gel3p foi confirmada *in vitro* através do ensaio de coimunoprecipitação, e a 5'-3' exoribonuclease estão envolvidas no metabolismo de RNAm, sugerindo uma função para *Pb*Gel3p nesse processo. A interação entre *Pb*Gel3p e a enzima serina esterase/lipase, que participa da via de biossíntese da âncora GPI, também foi confirmada por coimunoprecipitação. *Pb*Gel3p interage com o fator de transcrição Ctf1Bp e enzima 3-oxoacil redutase, fato que sugere seu envolvimento no metabolismo de lipídeos de *P. brasiliensis*. A interação com a proteína de resistência à leptomicina B Pmd1p sugere um papel para *Pb*Gel3p na resposta à agentes antifúngicos. O ensaio de *pull-down in vitro* resultou na identificação da proteína de choque térmico de 70 kDa de *P. brasiliensis*. A interação com essa proteína sugere que *Pb*Gel3p pode atuar na resposta à condições de estresse, como o aumento de temperatura. Com base nesses dados, estudos funcionais devem ser realizados para confirmar a multifuncionalidade de Gel3p em *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a thermodimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis prevalent in South America. In humans, infection starts by inhalation of fungal propagules that reach the pulmonary epithelium. The cell wall presents an essential role in the pathobiology of *P. brasiliensis*, since it is involved in the morphogenetic changes associated with the life cycle of this pathogen. The biosynthesis and remodeling of the cell wall polysaccharide network is required for fungal growth and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins are involved in these processes. The enzymes of the glucan-elongating (GEL) family are GPI-anchored proteins which have beta-1,3-glucanosyltransferase activity and play important role in the cross-linking of cell wall components in fungi. The *P. brasiliensis* genome possess 3 genes that encode for beta-1,3-glucanosyltransferases (Gel1p, Gel2p e Gel3p). With the aim of searching for other possible functions for beta-1,3-glucanosyltransferase 3 (*Pb*Gel3p) in *P. brasiliensis,* the interactions between this protein and others proteins of the fungus were investigated through the *Saccharomyces cerevisiae* two-hybrid system and pull-down assay. The two-hybrid system enables the study of interactions *in vivo* and, through this approach, 8 proteins which interact with *Pb*Gel3p were identified. The interaction with phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase its3 and protein kinase Dsk1p suggest the participation of *Pb*Gel3p in the cell division cycle. The RNA helicase Dbp5p, whose interaction with *Pb*Gel3p was *in vitro* confirmed by coimunoprecipitation, and the 5'-3' exoribonuclease are involved in the mRNA metabolism suggesting a function for *Pb*Gel3p in this process. The interaction between *Pb*Gel3p and the lipase/serine esterase, which participates on the biosynthesis of the GPI-anchor, was also confirmed by coimunoprecipitation. *Pb*Gel3p also interacts with the transcription factor Ctf1Bp and the 3-oxoacyl reductase enzyme, which suggests its involvement in the lipid metabolism. The interaction with the leptomycin B resistance protein Pmd1p suggests a role for *Pb*Gel3p in the response to antifungal drugs. The *in vitro* pull-down assay resulted in the identification of *P. brasiliensis* 70 kDa heat shock protein. The interaction with this protein suggests that *Pb*Gel3p may act in the response to stress conditions, as in the temperature increase. On basis of these data, functional studies may be carried out in order to confirm the Gel3p multifunctionality in *P. brasiliensis*.

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - *Paracoccidioides brasiliensis*: aspectos gerais

A micose sistêmica humana Paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez por Adolfo Lutz em 1908. Quatro anos mais tarde, Alfonso Splendore começou a estudar a doença e a morfologia do agente causal, propondo para este a denominação de *Zymonema brasiliense*. Em 1930, Floriano de Almeida estabeleceu um novo gênero dentro do reino Fungi e nomeou oficialmente o agente etiológico da nova doença como *Paracoccidioides brasiliensis* (Lacaz, 1994).

P. brasiliensis é um fungo dimórfico que apresenta morfologia celular distinta dependendo da temperatura de crescimento. Nos tecidos do hospedeiro ou a 36 ^{o}C *in vitro* este microrganismo cresce como levedura. A forma miceliana infectiva é encontrada em condições saprobióticas no ambiente ou quando cultivada em temperaturas inferiores a 28 ^{o}C (Bagagli *et al.*, 2006). Ambas as formas são multinucleadas, enquanto os esporos produzidos pelo micélio apresentam somente um núcleo (McEwen *et al.*, 1987b; Cano *et al.*, 1998). As leveduras de *P. brasiliensis* apresentam um aspecto de roda de leme de navio, onde uma célula central grande é circundada por células periféricas menores, as quais são brotamentos múltiplos originados por evaginações da célula-mãe. A forma miceliana pode ser caracterizada por micélios septados com conídios terminais ou intercalares (Queiroz-Telles, 1994; Restrepo-Moreno, 2003).

A mudança súbita de ambiente no momento da infecção faz com que fungos dimórficos patogênicos desenvolvam habilidades para sobreviver e invadir o hospedeiro. Assim, o dimorfismo de *P. brasiliensis* é um mecanismo essencial para a virulência e a patogenicidade. Já foi descrito que isolados incapazes de se diferenciar não são virulentos (Rooney e Klein, 2002). Um dos estímulos ambientais mais evidentes no dimorfismo de *P. brasiliensis* é a temperatura. O fungo se apresenta como micélio a 22 ^{o}C - 25 ^{o}C e como levedura a 35 ^{o}C - 37 ^{o}C (Brummer *et al.*, 1993). Estudos demonstraram que fatores nutricionais, além da temperatura, também podem influenciar no dimorfismo do fungo. A adição de soro fetal de bezerro tanto à meio de cultura complexo quanto à meio quimicamente definido permitiu preservar a expressão fenotípica de leveduras a 25° C (Villar *et al.*, 1988).

A classificação taxonômica de fungos é fundamentada na observação do fenótipo durante os estágios da reprodução sexuada. A fase teleomórfica ou sexual de *P. brasiliensis* é desconhecida, dificultando assim sua classificação taxonômica. Entretanto, a utilização de técnicas moleculares baseadas no RNA ribossomal (rRNA) e no DNA ribossomal (rDNA) são importantes ferramentas que tem facilitado o processo de classificação. Análises da subunidade ribossomal 25S para fungos dimórficos e dermatófitos permitiu classificar *P. brasilienis* juntamente com outros fungos dimórficos, como *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis*, como pertencente ao filo Ascomycota, à ordem Onygenales e à família Onygenaceae (Leclerc *et al.*, 1994). Com base em análises filogenéticas moleculares, *P. brasiliensis* é atualmente descrito como pertencente a reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002).

Análises filogenéticas baseadas em dados de polimorfismo de 65 isolados de *P. brasiliensis* permitiram a classificação do fungo em três espécies filogenéticas distintas: S1 (espécie 1) com 38 isolados, PS2 (espécie filogenética 2) com 6 isolados e PS3 (espécie filogenética 3) com 21 isolados. S1 compreende isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. PS2 compreende 5 isolados brasileiros e 1 venezuelano. PS3 compreende isolados somente da Colômbia, sendo considerada evolucionariamente independente (Matute *et al.*, 2006). No intuito de analisar as relações filogenéticas entre isolados de *P. brasiliensis,* um estudo baseado nas regiões codantes, não codantes e ITS (seqüência espaçadora interna - *internally transcribed sequence*) foi feito em 21 isolados, sendo 7 deles novos. Todos os isolados se agruparam nos grupos filogenéticos descritos anteriormente (S1, PS2 e PS3), com exceção do isolado *Pb*01, sugerindo a possibilidade da existência de mais de três espécies filogenéticas em *P. brasiliensis* (Carrero *et al.*, 2008). A possível existência de uma nova espécie filogenética foi então investigada através da comparação entre o grupo formado pelas espécies S1, PS2 e PS3 e o grupo "Pb*01-like*", compreendendo o isolado *Pb*01 e outros isolados da América Latina. A análise de 13 *loci* polimórficos indicou que o fluxo genético entre estes dois grupos ("Pb*01-like*" e S1, PS2 e PS3) foi bloqueado, sugerindo isolamento reprodutivo. Além disso, análises morfológicas de representantes de cada grupo foram feitas e os resultados corroboraram os dados filogenéticos. Com base nesses dados, foi proposta a

descrição de uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides,* contendo o clado "Pb*01-like*" (Teixeira *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, grandes avanços no conhecimento da organização genômica de *P. brasiliensis* têm sido testemunhados. Entretanto, conclusões definitivas sobre vários aspectos ainda são aguardadas. Esta dificuldade de se obter respostas decisivas deve-se ao fato de não se conhecer a fase teleomórfica do fungo, apesar de eventos de recombinação terem sido descritos em *P. brasiliensis* (Matute *et al.*, 2006). Através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi possível identificar 4 ou 5 cromossomos com 2-10 Mb tanto de fungos isolados do meio ambiente, quanto de isolados clínicos, estimando-se, desta maneira, que *P. brasiliensis* apresente um genoma variando entre 23-31 Mb (Feitosa *et al.*, 2003). A análise do ciclo celular de 10 isolados de *P. brasiliensis* por citometria de fluxo revelou que o fungo apresenta um genoma variando de 26,3 a 35,5 Mb por célula de leveduras uninucleadas. O genoma dos conídios apresentou um tamanho de 30,2 a 30,9 Mb, não havendo, portanto, nenhuma diferença significativa com a forma de levedura (Almeida *et al.*, 2007). Recentemente, o seqüenciamento dos genomas de três isolados de *P. brasiliensis*, *Pb*01, *Pb*18 e *Pb*03, foi realizado. As análises confirmaram a presença de 5 cromossomos em cada isolado. O genoma do isolado *Pb*01 é composto por 9.132 genes, sendo o maior entre os três isolados. Este projeto comparativo designado "Genômica Comparativa de *Coccidioides* e outros Fungos Dimórficos", tem como meta examinar a variabilidade genética entre os três isolados de *Paracoccidioides* sp. e determinar características comuns e específicas no grupo de fungos patógenos dimórficos (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

Para a maioria das doenças infecciosas não transmissíveis, as áreas nas quais a infecção ocorre geralmente não coincidem com aquelas nas quais os casos são diagnosticados. Com base nos longos períodos de latência registrados para a PCM, o termo "reservárea" foi proposto para designar os lugares onde *P. brasiliensis* encontra-se na natureza e nos quais o homem adquire a infecção (Borelli, 1964). Em virtude desse período de latência prolongado no hospedeiro humano, o nicho ecológico de *P. brasiliensis* permanece indeterminado (Montenegro, 1994). Entretanto, estudos sugerem que a forma miceliana do fungo viva saprobioticamente na natureza, pois o mesmo já foi isolado de solo, água e plantas (Restrepo *et al.*, 2001). Em decorrência do

isolamento raro e não reprodutível do fungo do solo, acredita-se que este ambiente não seja o habitat permanente do patógeno, sugerindo que o mesmo reside por tempo variável neste local (Conti-Diaz, 2007). O cultivo de isolados de *P. brasiliensis* em diferentes tipos de solo demonstrou que o fungo pode se desenvolver em solos arenosos e argilosos, com alta umidade. A produção de conídios, um fator importante por aumentar a capacidade de sobrevivência no meio ambiente, foi observada em alguns isolados. Foi observado também que, em solos com altos níveis de alumínio, o crescimento de *P. brasiliensis* pode ser inibido ou limitado (Terçarioli *et al.*, 2007).

Supõe-se que o fungo ocorra normalmente em ambientes úmidos, próximos a rios, onde possa ser protegido por representantes de espécies aquáticas heterotérmicas como moluscos, anfíbios, peixes e artrópodes. Estes organismos forneceriam nutrientes, umidade, competição biológica limitada e temperatura apropriada ao parasito para sobrevivência do mesmo no meio ambiente (Conti-Diaz, 2007).

P. brasiliensis já foi isolado de animais silvestres, como tatus (Bagagli *et al.*, 1998; Corredor *et al.*, 2005), e animais domésticos, como cachorros (Ricci *et al.*, 2004). Estes organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos com a doença (Conti-Diaz, 2007). Tatus são animais que possuem contanto intenso com o solo, onde constroem buracos para se protegerem. Através da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polimerase chain reaction*) *P. brasiliensis* foi identificado nas fezes e em amostras de solo coletadas de buracos de tatus naturalmente infectados (Theodoro *et al.*, 2005). Dessa forma, sugere-se um possível papel do tatu no ciclo natural do fungo devido à sua habilidade de eliminar e/ou disseminar o patógeno no ambiente. Ainda através da técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos ITS específicos para *P. brasiliensis,* foram realizados estudos de detecção molecular em animais selvagens mortos em estradas e rodovias. Detectou-se o fungo em tatu, porco-da-índia, porco espinho, guaxinim e furão. Os dados revelam que a infecção em animais silvestres de áreas endêmicas é mais alta do que inicialmente postulado e demonstram a importância do uso de animais mortos em estradas no estudo eco-epidemiológico de *P. brasiliensis* (Richini-Pereira *et al.*, 2007).

1.2 - Paracoccidioidomicose

A PCM é uma micose sistêmica granulomatosa. Admite-se que os propágulos produzidos pela forma miceliana de *P. brasiliensis* sejam inalados pelo hospedeiro humano, causando assim a infecção. Ao atingirem o epitélio pulmonar, tais propágulos transformam-se em levedura, a forma parasitária (McEwen *et al.*, 1987a). A partir dos pulmões o fungo pode disseminar-se através das vias hematogênica e/ou linfática, chegando a outros órgãos e sistemas (Camargo e Franco, 2000; Valera *et al.*, 2008). A interação entre o fungo e o sistema imunológico do hospedeiro determina o progresso da patologia, permitindo a definição da forma subclínica, ou assintomática, em indivíduos imunocompetentes e das formas clínicas em imunocomprometidos. São duas a principais formas clínicas da PCM: forma aguda, ou juvenil, e forma crônica, ou adulta. A primeira é a mais severa, caracterizada por um rápido curso, levando a significativas taxas de mortalidade devido, principalmente, à hipertrofia de órgãos do sistema reticuloendotelial. O tipo adulto possui progressão lenta, afeta principalmente indivíduos do sexo masculino e é caracterizada por manifestações pulmonares (Brummer *et al.*, 1993).

A doença acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, entre 30 e 60 anos de idade que desenvolvem atividades agrícolas. Supõe-se que o manejo do solo permita um maior contato desses trabalhadores com os propágulos do fungo, aumentando assim a incidência da doença nessa população (Brummer *et al.*, 1993). Análises da transição dimórfica de 3 isolados de *P. brasiliensis* na presença do hormônio feminino 17β-estradiol foram realizadas. Os resultados demonstraram que, na presença do hormônio, o número de células que transitaram para a forma de levedura era menor, quando comparado ao controle. No citoplasma dos 3 isolados havia uma proteína que apresentava alta afinidade de ligação ao 17β-estradiol. Acredita-se que esta proteína funcione como um receptor para o hormônio e que este inibe a transição micélio-levedura, impedindo, desta forma, o estabelecimento da infecção (Restrepo *et al.*, 1984). Estes dados, aliados ao menor contato de mulheres com o solo, corroboram dados epidemiológicos que demonstram a menor incidência da PCM no sexo feminino (Aristizabal *et al.*, 1998).

A distribuição geográfica da PCM é restrita a países da América Latina, com maior incidência no Brasil. Como não há notificação compulsória da doença, os dados sobre sua incidência são baseados em relatos de inquéritos epidemiológicos e de séries

de casos. Acredita-se que em zonas endêmicas a incidência varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 casos por 100 mil habitantes ao ano (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). No Brasil, entre o anos de 1980 a 1995, a PCM foi considerada como a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias (Coutinho *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado que a maioria das mortes causadas por micoses sistêmicas entre 1996 e 2006 ocorreu devido à PCM, com uma média anual de 148 mortes no período 2005-2006. Os maiores índices de mortalidade estão na região Sudeste, principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, e na região Sul, nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul (Prado *et al.*, 2009).

Casos autóctones já foram diagnosticados na Europa, nos Estados Unidos da América e na Ásia (Joseph *et al.*, 1966; Chikamori *et al.*, 1984; Ajello e Polonelli, 1985). Isso pode ser explicado pela existência de um período assintomático da PCM, o qual é em média 15,3 anos, que ocorre após o contato do paciente com a área endêmica até a manifestação da doença (Brummer *et al.*, 1993).

1.3 - Parede celular de fungos

O reino Fungi é extremamente diverso, sendo também variadas as formas celulares encontradas em cada espécie, como leveduras, hifas ramificadas, esporos e outras estruturas reprodutivas. A integridade e o formato de cada uma dessas células fúngicas são dependentes da parede celular, que desempenha papel essencial na interação do fungo com o ambiente. Esta estrutura, antes considerada um exoesqueleto inerte, é dinâmica e sofre constantes modificações de acordo com o crescimento e condições ambientais. Exerce papel protetor, funcionando como uma barreira inicial contra ambientes hostis. Ao mesmo tempo, contém moléculas hidrolíticas e tóxicas, requeridas para a invasão do fungo em diferentes nichos ecológicos. Dado seu papel biológico essencial na fisiologia fúngica e ausência em células de mamíferos, a parede celular é considerada um alvo interessante para agentes antifúngicos (Latge, 2007).

A parede celular de fungos, embora variável em composição entre as diferentes espécies, é composta por polissacarídeos e proteínas, como mostrado na Figura 1. Os polissacarídeos representam mais de 90% dessa estrutura e são constituídos por três monossacarídeos: glicose, manose e N-acetilglicosamina (GlcNAc). O polissacarídeo β-1,3-glicana, formado a partir da glicose, é o principal componente da parede. Outro

polissacarídeo, β-1,6-glicana, está presente em quantidades inferiores e desempenha um papel importante na formação de ligações cruzadas. Os polissacarídeos de manose ligam-se a proteínas, formando as manoproteínas, localizadas na superfície externa da parede celular. Os monossacarídeos de GlcNAc formam a quitina através de ligações β-1,4. Apesar da pequena quantidade na parede celular, em *Saccharomyces cerevisiae* este polissacarídeo é essencial para a viabilidade celular devido, provavelmente, ao seu papel na formação do septo. O septo é formado entre a célula mãe e a célula filha durante a divisão celular a fim de permitir a separação de ambas sem ocorrer lise celular. (Shaw *et al.*, 1991; Cabib *et al.*, 2001).

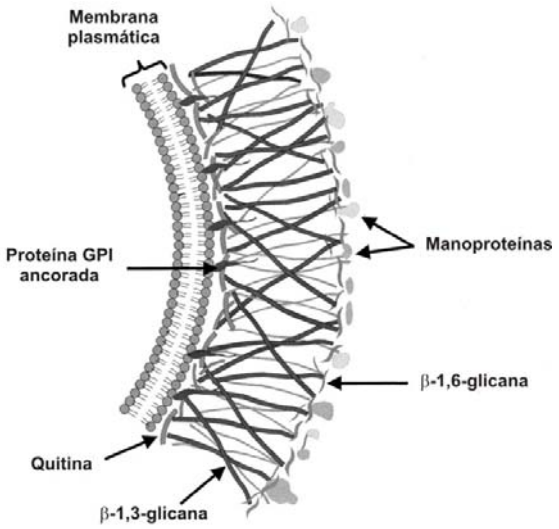

Figura 1 - Esquema mostrando a estrutura básica da parede celular de fungos. GPI, glicosilfosfatidilinositol. Adaptação: http://aem.asm.org/cgi/content-nw/full/67/7/2883/F1.

O polímero β-1,3-glicana é o componente estrutural da parede ao qual os outros constituintes se ligam. Assim, a síntese do mesmo é essencial para a formação de uma parede celular íntegra. Um complexo protéico ligado à membrana plasmática, denominado glicana sintase, é ativado por GTP e utiliza glicose uridina difosfato (UDP-glicose) como substrato para a síntese desse polissacarídeo (Shematek e Cabib, 1980). Estudos demonstraram que em *Aspergillus fumigatus* β-1,3-glicana é um polímero ramificado, ao qual se ligam a quitina, por meio de ligações β-1,4, polímeros de manose e de β-1,3/1,4-glicana (Fontaine *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos da parede celular de fungos são divididos em dois grupos de acordo com sua solubilidade em soluções básicas em alta temperatura. O núcleo

estrutural da parede é insolúvel nessas soluções e é composto principalmente por cadeias de β-1,3-glicana ligadas covalentemente à quitina, a qual é responsável pela insolubilidade (Kollar *et al.*, 1995; Fontaine *et al.*, 2000; Latge, 2007).

A superfície externa da parede celular está em permanente contato com o ambiente, permitindo várias interações entre o microrganismo e o meio no qual ele se encontra. Nela se localizam as proteínas da parede, ou manoproteínas, ligadas covalentemente aos polissacarídeos de glicana (Firon *et al.*, 2004). Essas proteínas possuem um peptídeo sinal amino-terminal (N-terminal) que as direcionam para a via secretória, na qual são modificadas postraducionalmente através da adição de oligossacarídeos N- e O- ligados. A adição dos oligossacarídeos inicia-se no retículo endoplasmático (RE) e é finalizada no Golgi. Nessas organelas também ocorrem modificações extensivas nesses pequenos polímeros, processo que explica a diversidade de componentes sacarídicos presente nas glicoproteínas (Gemmill e Trimble, 1999).

Adicionalmente às modificações por oligossacarídeos, algumas proteínas da parede celular recebem uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) como modificação pós-traducional. Essas proteínas possuem, além do peptídeo sinal N-terminal, um sinal de adição de âncora GPI na extremidade carboxi-terminal (C-terminal). A sequência sinal é um motivo que possui uma região hidrofóbica e outra denominada sítio ômega (ω). Esta sequência é reconhecida por um complexo protéico denominado GPI transamidase localizado na membrana do RE. Este complexo cliva a proteína alvo no sítio ω e promove a transferência da âncora GPI para a extremidade C-terminal recém gerada (Eisenhaber *et al.*, 1998). As proteínas que receberam uma âncora GPI no RE são então transportadas para o complexo de Golgi em vesículas distintas daquelas das proteínas não ligadas à âncora GPI (Muniz *et al.*, 2001). A partir desta organela elas podem ter dois destinos: ou se ligam permanentemente à membrana plasmática ou se dirigem à parede celular (Lu *et al.*, 1994).

A âncora GPI consiste de um grupo lipídico, responsável pela ligação à membrana plasmática, um grupo inositol, um grupo glicosamina, três grupos manose e, por fim, um grupo fosfoetanolamina, que é o ponto onde ocorre a ligação da âncora com a região C-terminal da proteína (Pittet e Conzelmann, 2007) (Figura 2).

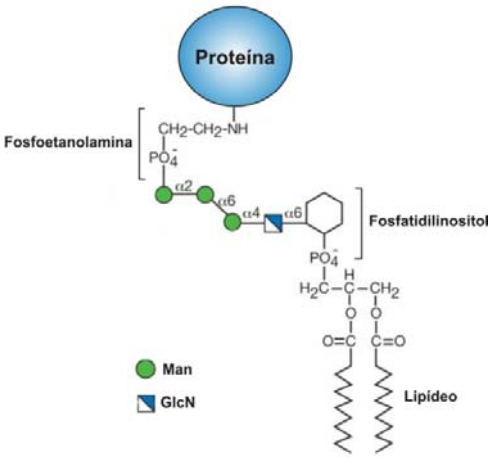

Figura 2 - Estrutura central de uma âncora GPI. A proteína é ancorada à fosfoetanolamina através de sua extremidade C-terminal. Man, manose; GlcN, glicosamina. Adaptação: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch21.

As proteínas GPI-ancoradas formam uma ampla classe de moléculas funcionalmente diversas e podem ser agrupadas de acordo com sua função. Muitas delas auxiliam na construção e manutenção da resistência mecânica dos componentes da parede celular, tendo assim um papel estrutural (Teparic *et al.*, 2004). Em *Neurospora crassa* isto é confirmado pelos fenótipos causados em mutantes nulos para genes da via biossintética da âncora GPI: morfologia alterada, taxa de crescimento reduzida e defeitos pronunciados na parede celular (Bowman *et al.*, 2006). Outras participam dos processos de adesão celular, na formação de biofilme, floculação, reprodução e crescimento invasivo (Bony *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2000; Reynolds e Fink, 2001), além de contribuir para a virulência em alguns organismos (Hung *et al.*, 2002). Proteínas GPI-ancoradas também podem desempenhar funções enzimáticas, como glicosiltransferases e hidrolases, promovendo o remodelamento da parede celular através do rompimento e da formação de ligações glicosídicas (Mouyna *et al.*, 2000b; Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009).

1.3.1 - Beta-1,3-glicanosiltransferases

O polissacarídeo β-1,3-glicana é o principal constituinte da parede celular na maioria dos fungos (Manners *et al.*, 1973; Fontaine *et al.*, 2000). Após serem sintetizadas por um complexo de glicana sintase localizado na membrana plasmática, as cadeias de glicana geradas são deslocadas para o espaço periplasmático (Beauvais *et al.*,

1993). Posteriormente, essas cadeias lineares são ramificadas, alongadas e remodeladas com a finalidade de gerar uma parede celular estável e íntegra, capaz de neutralizar a pressão osmótica interna e determinar a morfologia celular (Lesage e Bussey, 2006).

Durante um estudo sobre atividades enzimáticas envolvidas na organização da parede celular de *A. fumigatus*, uma nova atividade de β-1,3-glicanosiltransferase foi identificada bioquimicamente (Hartland *et al.*, 1996). O gene codificante para a enzima responsável por essa atividade, Gel1p (Glicanosiltransferase de alongamento de glicana), foi clonado e sequenciado (Mouyna *et al.*, 2000a). Gel1p é uma proteína GPI-ancorada e a sequência predita de aminoácidos mostrou que ela é homóloga aos produtos das famílias gênicas GAS (glicofosfolipídeo ancorado à superfície) em *S. cerevisiae*, PHR (pH-regulado) em *Candida albicans* e EPD (essencial para o desenvolvimento de pseudohifa) em *Candida maltosa* (Popolo *et al.*, 1993; Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Nakazawa *et al.*, 1998). Esses genes pertencem à Família 72 de glicosil-hidrolases (GH72) do banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZy - http://www.cazy.org/fam/GH72.html), e codificam um grande grupo de enzimas envolvidas na montagem da parede celular (Coutinho e Henrissat, 1999).

O genoma de *A. fumigatus* possui sete genes pertencentes à família GEL, agrupados dentro de duas subfamílias de acordo com o grau de identidade: *gel3*, *gel4*, *gel5* e *gel7* (de 53 a 65% de identidade) e *gel1*, *gel2* e *gel6* (de 36 a 38% de identidade) (Mouyna *et al.*, 2005). *S. cerevisiae* apresenta cinco genes que codificam para proteínas homólogas (*gas1-gas5*). Com exceção de Gas3p, todas as enzimas apresentam atividade de β-1,3-glicanosiltransferase. A extremidade C-terminal das proteínas GAS difere em comprimento e pela presença ou ausência de um domínio rico em cisteína, denominado Cys-box, com cerca de 100 aminoácidos. Este domínio é similar ao módulo de ligação a carboidrato (*Carbohydrate-binding module* - CBM43) e está presente somente em Gas1p e Gas2p. A construção de uma árvore filogenética a partir do domínio N-terminal dos membros da família GH72 permitiu a distinção de duas subfamílias: (i) a subfamília $GH72^{+}$, compreendendo proteínas que possuem o domínio Cys-box na região C-terminal, (ii) e a subfamília $GH72^{-}$, abrangendo proteínas que não contêm o Cys-box (Ragni *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que a remoção deste domínio de Gas1p de *S. cerevisiae* foi capaz de eliminar totalmente a atividade enzimática, mostrando-se essencial para a função e estabilidade da proteína (Carotti *et al.*, 2006). Recentemente, estudos cristalográficos demonstraram pela primeira vez a estrutura de uma enzima da

família GH72, a Gas2p de *S. cerevisiae*, revelando um núcleo catalítico interagindo firmemente com o módulo CBM43 da região C-terminal (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009).

As enzimas das famílias GEL/GAS catalisam dois passos da reação de β-1,3-glicanosiltransferase: (i) inicialmente uma ligação glicosídica interna de uma cadeia de β-1,3-glicana doadora é clivada e a porção redutora é liberada; (ii) posteriormente, essa extremidade é transferida para uma extremidade não redutora de uma cadeia de β-1,3-glicana receptora, resultando assim em seu alongamento. Assim, essas proteínas agem transferindo segmentos de β-1,3-glicana para pontos ramificados de outras glicanas, criando sítios de ancoragem para outros componentes da parede (Mouyna *et al.*, 2005) (Figura 3).

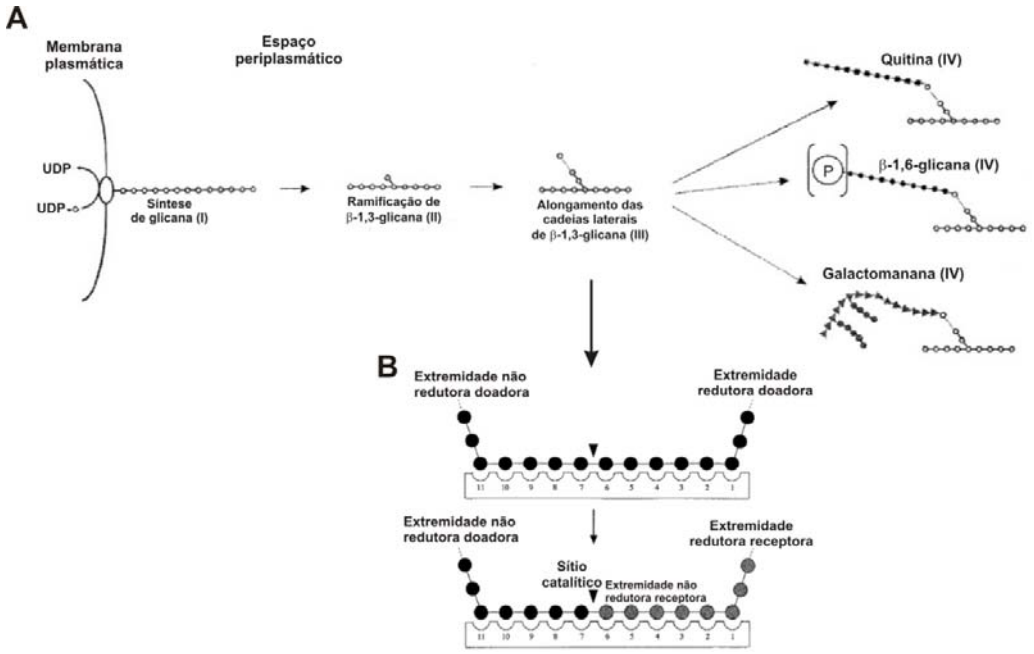

Figura 3 - Eventos sequenciais envolvidos na síntese e modificações pós-síntese das β-1,3-glicanas na parede celular. A. (I) Biossíntese da cadeia linear de β-1,3-glicana; (II) ramificação de β-1,3-glicanas através de ligações β-1,6; (III) alongamento da cadeia lateral de β-1,3-glicana; e (IV) ligação cruzada de outros polímeros (quitina, β-1,6-glicana, galactomana) em extremidades não reduzidas de cadeias laterais de β-1,3-glicana. **B.** Modelo de sítio ativo para a atividade de transferase. É proposto que o sítio ativo consiste de 11 sítios de ligação à glicose, com o sítio catalítico situado entre os sítios 6 e 7 a partir da extremidade redutora. P, proteína. Adaptação: Mouyna *et al*. (2000a); Hartland *et al.* (1996).

Foi demonstrado que as proteínas da família GH72 possuem sítios catalíticos apresentando dois resíduos conservados de glutamato, sugerindo que elas possuem a mesma atividade de β-1,3-glicanosiltransferase. Esta atividade já foi demonstrada para os membros da família GAS em *S. cerevisiae*, para Gel1p e Gel2p em *A. fumigatus* e para Phr1 e Phr2 em *C. albicans* (Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005; Ragni *et al.*, 2007). Ademais, experimentos de complementação demonstraram que Gel1p, Gel2p e Phr1p foram capazes de recuperar os defeitos morfológicos de uma linhagem de *S. cerevisiae* mutante para *gas1*, evidenciando que essas proteínas são relacionadas funcionalmente (Vai *et al.*, 1996; Mouyna *et al.*, 2000a; Mouyna *et al.*, 2005).

Embora essas enzimas compartilhem atividades enzimáticas comuns, a expressão dos genes responsáveis por sua codificação pode estar sujeita ao controle de diferentes sinais. Em *C. albicans* e *C. maltosa* o pH do meio de cultura exerce um papel fundamental na expressão gênica, sendo que em *C. albicans phr1* é expresso em pH igual a 5.5 ou superior e *phr2* em valores de pH inferiores a 5.5 (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlschlegel e Fonzi, 1997; Nakazawa *et al.*, 1998). Em contraste, *gas1* de *S. cerevisiae,* e *gel1* e *gel2* de *A. fumigatus* são expressos de forma constitutiva, independentemente do pH do meio (Popolo *et al.*, 1993; Mouyna *et al.*, 2005). Esses padrões de expressão particulares podem estar relacionados a uma melhor adaptação aos nichos que os microrganismos colonizam, como ambientes com valores diferentes de pH (De Bernardis *et al.*, 1998).

Estudos de disrupção gênica em vários organismos demonstraram a função essencial das glicanosiltransferases na morfogênese de fungos. Em *S. cerevisiae*, a ausência de atividade de Gas1p ocasiona uma morfologia celular anormal, com células circulares e maiores, defeitos na maturação do brotamento, separação celular e redução na taxa de crescimento. As células tornam-se sensíveis à presença de *Calcofluor White*, um agente que interfere na montagem da parede celular, e amplifica o efeito das mutações relacionadas a esta estrutura (Popolo *et al.*, 1993; Ram *et al.*, 1994). Além disso, o conteúdo de β-1,3-glicana é menor nas células mutantes, fornecendo evidências de que Gas1p participa na retenção dessas moléculas na superfície celular. Ao mesmo tempo em que há diminuição desses polímeros, há um aumento de quitina e manana, sugerindo que o enfraquecimento da parede celular causado pela perda de Gas1p induz um conjunto de reações compensatórias para garantir a integridade celular (Ram *et al.*, 1998). Análises fenotípicas do mutante Δ*gel2* e do mutante duplo Δ*gel1*Δ*gel2* em *A.*

fumigatus revelaram conidiogênese anormal, crescimento mais lento e composição da parede celular alterada (Mouyna *et al.*, 2005). Em *C. albicans* a deleção de *phr1* e *phr2* resultou em defeitos no crescimento e morfogênese, redução de β-1,6-glicanas associadas a β-1,3-glicana e um aumento no conteúdo de quitina na parede celular. Essa maior quantidade de quitina e sua ligação com manoproteínas parece ser uma resposta secundária a fim de prevenir a liberação excessiva dessas proteínas, resultado da inabilidade das células em estabelecer ligações cruzadas entre manoproteínas e glicanas (Fonzi, 1999).

Além de desempenhar papel importante no estabelecimento de uma parede celular estruturada e íntegra, as β-1,3-glicanosiltransferases também contribuem para a virulência em alguns organismos. Em *C. albicans*, o mutante nulo Δ*phr1* mostrou-se avirulento em um modelo de infecção sistêmica em camundongo, enquanto o mutante Δ*phr2* apresentou-se avirulento em um modelo de infecção vaginal, corroborando o fato de este último ser expresso em ambientes ácidos (De Bernardis *et al.*, 1998). Os mutantes Δ*gel2* e Δ*gel1*Δ*gel2* de *A. fumigatus* apresentaram virulência reduzida em um modelo de aspergilose invasiva em camundongo (Mouyna *et al.*, 2005). Em plantas, o mutante Δ*gas1* de *Fusarium oxysporum* mostrou redução de virulência dramática durante a infecção de tomate, tanto na raiz, quanto no tecido da fruta (Caracuel *et al.*, 2005). Em alguns patógenos, as proteínas GPI-ancoradas também se mostraram imunogênicas. A imunização de camundongos com Gel1p recombinante de *Coccidioides posadasii* mostrou ser bastante eficaz, conferindo proteção imunogênica contra o patógeno (Delgado *et al.*, 2003). Além disso, as formas recombinantes das proteínas GAS de *S. cerevisiae* e Gel1p e Gel2p de *A. fumigatus* foram reconhecidas especificamente por anticorpos presentes no soro de pacientes infectados por *Aspergillus* e *Candida* (Arroyo *et al.*, 2007).

Recentemente foi demonstrado que Gas1p de *S. cerevisiae* participa do silenciamento transcricional mediado através da estrutura da cromatina. Nesse processo algumas regiões do genoma, como os telômeros, o DNA ribossomal (rDNA) e o *loci* do tipo reprodutivo, são reprimidas transcricionalmente através da atividade da histona deacetilase Sir2p. Os experimentos demonstraram que em mutantes Δ*gas1* há uma diminuição no silenciamento dos telômeros e um aumento no silenciamento do rDNA, não sendo observadas diferenças em relação ao *loci* do tipo reprodutivo. Análises dos mutantes Δ*gas1* inativos enzimaticamente mostraram que a atividade de β-1,3-

glicanosiltransferase é requerida para o silenciamento transcricional nos telômeros. Além disso, foi demonstrado através de ensaios de duplo-híbrido e *pull-down* GST que Gas1p interage com Sir2p, sugerindo que a ação daquela no silenciamento seja mediada através da interação com Sir2p. Esses resultados evidenciaram uma nova e inesperada função nuclear para a enzima Gas1p (Koch e Pillus, 2009).

1.4 - Parede celular de *P. brasiliensis*

Em fungos patogênicos a transição morfogenética ou dimorfismo é geralmente requerida para expressar certo grau de virulência. A mudança de ambiente súbita no momento da infecção exige que o microrganismo adapte-se rapidamente para garantir a sobrevivência e posterior invasão no hospedeiro. A principal característica do processo morfogenético é a conversão morfológica, geralmente para levedura, acompanhada por um remodelamento da parede celular (Bastos *et al.*, 2007).

Os principais componentes da parede celular de micélio e levedura de *P. brasiliensis*, assim como em outros fungos, são carboidratos, proteínas e lipídeos. Em ambas as formas, o conteúdo de glicanas e lipídios é similar (36-47% e 5-10%, respectivamente). Em levedura, a quantidade de quitina (37-48%) é maior que em micélio (7-18%), no qual o conteúdo protéico (24-41%) é maior que em levedura (7-14%) (Kanetsuna *et al.*, 1969). Os principais polissacarídeos da parede celular de micélio são β-glicanas e galactomananas, enquanto em levedura predominam α-glicanas (Kanetsuna *et al.*, 1972). Estudos de microscopia eletrônica mostraram que a parede de micélio é mais fina que a de levedura e que isto pode ser devido às diferenças na composição desta estrutura em ambas a formas (Carbonell e Rodriguez, 1968).

Em *P. brasiliensis* a transição dimórfica é acompanhada por modificações na parede celular. A alteração mais evidente durante a transição micélio-levedura é a mudança na ligação dos polímeros de glicana, de β-1,3-glicana para α-1,3-glicana, resultando em um aumento de α-glicanas e no rearranjo espacial desses polissacarídeos (San-Blas e San-blas, 1994). Já que as mudanças morfogenéticas são essenciais para o estabelecimento da infecção e que, durante esse processo a parede celular sofre transformações, pode-se dizer que esta estrutura é essencial na patobiologia do fungo. Já foi descrito que β-1,3-glicana, o principal componente da parede de micélio, é um importante imunomodulador (Silva *et al.*, 1997). Algumas evidências demonstraram que α-1,3-glicana pode estar associada à virulência, já que foi descrito que há uma

diminuição da mesma em mutantes incapazes de produzir este polímero. Ademais, o cultivo *in vitro* prolongado de isolados virulentos de *P. brasiliensis* resulta em parede celular mais fina e níveis mais baixos de α-1,3-glicana, associados à perda gradual de virulência. Além disso, a recuperação do fungo de animais parece restaurar essas alterações (San-Blas e San-Blas, 1977). Todavia, os mecanismos através dos quais esse polissacarídeo contribui para a virulência não são bem entendidos. Sugere-se que sua presença em maior quantidade na parede celular pode ajudar na evasão dos efeitos imunomodulatórios causados por β-1,3-glicanas (Anjos *et al.*, 2002).

A composição de lipídeos da parede celular também sofre mudanças durante o dimorfismo em *P. brasiliensis*, sendo que a fase leveduriforme possui duas vezes mais lipídeos que micélio (Manocha, 1980). Além disso, a transição morfológica é acompanhada por modificações na composição de lipídeos da membrana celular. Sugere-se que tais modificações são requeridas para regular a atividade enzimas ligadas à membrana, como quitina sintases e glicana sintases (Toledo *et al.*, 1999).

Além dos componentes já mencionados, estudos têm evidenciado que enzimas da via glicolítica e outras proteínas citoplasmáticas, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Barbosa *et al.*, 2006), a triose fosfato isomerase (Pereira *et al.*, 2007), a DnaJ mitocondrial (Batista *et al.*, 2006), a proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP60) (Passos *et al.*, 2003) e a enzima formamidase (Borges *et al.*, 2009), estão presentes na parede celular de *P. brasiliensis.* Estes dados demonstraram a multifuncionalidade de algumas proteínas, que desempenham funções variadas em locais diferentes da mesma célula.

Análises do transcritoma do fungo em busca de sequências que codificam proteínas relacionadas à parede celular resultaram na identificação de genes envolvidos na estrutura, composição e organização da parede. Foram encontradas sequências codificantes para: quitina sintase (*Pbrchs6*), a qual está presente apenas em micélio; manosiltranferases, como *mnn2*, responsáveis pela adição de resíduos de manose às glicoproteínas de parede; glicanosiltransferases (*Pbgel1*, *Pbgel2* e *Pbgel3*) e hidrolases, como endoquitinase (*Pbcts1*) e endo- e exoglicanases (Tomazett *et al.*, 2005).

O rastreamento para proteínas ancoradas por GPI no transcritoma de *P. brasiliensis* resultou na identificação de vinte produtos gênicos, classificados nas seguintes categorias funcionais: enzimas, antígenos de superfície, moléculas de adesão e aquelas com papel estrutural (Castro *et al.*, 2005). Dentre as vinte proteínas, foram

encontradas nove enzimas, estando entre elas as β-1,3-glicanosiltransferases (Gel1p, Gel2p e Gel3p), além de proteínas envolvidas na síntese, ligação e clivagem da âncora GPI. A enzima superóxido dismutase 1 (SOD1), localizada no citosol e no espaço intermembrana da mitocôndria e outras organelas, também foi encontrada (Sturtz *et al.*, 2001). A enzima Gel1p, além de sua atividade no remodelamento das cadeias de β-1,3-glicanas, também foi classificada na categoria de antígenos de superfície, já que conferiu proteção imunogênica em camundongos infectados com *C. posadasii* (Delgado *et al.*, 2003).

Após a adição da âncora GPI, as proteínas podem ser direcionadas para a parede ou membrana celular. Evidências indicam que a localização celular dessas proteínas pode ser, pelo menos parcialmente, determinada pelos aminoácidos que se localizam na região do sítio ω. Assim, dois tipos de sequência sinal foram propostos para a localização de proteínas GPI-ancoradas: (i) os resíduos de aminoácidos específicos V, I ou L no sítio ω-4 e ω-5, a 5' do sítio ω e Y ou N no sítio ω-2 para localização na parede celular e (ii) resíduos dibásicos, como por exemplo R e K, em uma pequena região a 5' do sítio ω (ω-menos) para a localização na membrana plasmática (Caro *et al.*, 1997; Vossen *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; Hamada *et al.*, 1999). A análise *in silico* dos aminoácidos localizados na região do sítio ω das proteínas GPI-ancoradas identificados no transcritoma de *P. brasiliensis* sugeriu que as três proteínas da família GEL localizam-se na membrana plasmática (Castro *et al.*, 2005).

Recentemente foi demonstrado que a β-1,3-glicanosiltransferase 3 de *P. brasiliensis* (*Pb*Gel3p) está presente na superfície celular de micélio e levedura e possui similaridade funcional às famílias GAS, PHR e EPD, relacionadas à morfogênese da parede celular. Experimentos de *Southern blot* mostraram que o gene codificante para Gel3p está presente em uma cópia no genoma do fungo, o que foi confirmado com o seqüenciamento completo do genoma de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html). Análises dos níveis de transcritos e de proteína evidenciaram que ambos estão presentes em maior quantidade em micélio. Além disso, estudos de complementação revelaram que *Pb*Gel3p é capaz de recuperar o fenótipo do mutante Δ*gas1* de *S. cerevisiae*, indicando que esta proteína está associada à parede celular e provavelmente participa do seu remodelamento (Castro *et al.*, 2009).

1.5 - Dinâmica da parede celular

A parede celular é uma estrutura robusta, que confere resistência mecânica e define a forma celular. Ao mesmo tempo, ela é dinâmica e se modifica constantemente em resposta a sinais externos e aos diferentes estágios do ciclo celular da célula fúngica. A natureza dinâmica da parede resulta de ações combinadas das glicoproteínas presentes em sua estrutura. Essas proteínas são classificadas em duas grandes categorias: enzimas associadas à parede e proteínas estruturais. As primeiras incluem quitinases, glicanases e peptidases, as quais estão envolvidas ativamente na síntese e remodelamento da parede. As proteínas estruturais são incorporadas na superfície celular, mas não possuem atividade enzimática. Elas estão relacionadas à migração celular, fusão e reprodução, adesão e geralmente são moléculas as quais outros componentes da parede se ligam (Rast *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2005).

A integridade da célula pode tornar-se comprometida diante da ação de fatores físicos e/ou químicos que alterem a estrutura da parede celular. Em resposta a esses fatores, uma série de eventos é desencadeada, como modificações na composição da parede dependendo da fonte de carbono, disponibilidade de oxigênio e pH externo (Klis *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga e Francois, 2003). Variações na proporção relativa dos polímeros que constituem a parede também auxiliam na manutenção de sua integridade. A redução ou ausência de qualquer componente é recompensada através da síntese de outros polímeros. O exemplo clássico é o aumento na quantidade de quitina em mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na síntese de β-1,3-glicana (Dallies *et al.*, 1998).

A expressão de alguns genes relacionados à parede também pode mudar de acordo com as condições ambientais. Os genes *fks1* e *gsc2* de *S. cerevisiae* codificam as subunidades catalíticas da β-1,3-glicana sintase tendo, portanto, a mesma função. Entretanto, eles apresentam padrões de expressão diferentes. *Fks1* é expresso durante o crescimento vegetativo, enquanto a expressão de *gsc2* é ativada durante o crescimento vegetativo na presença de baixos níveis de glicose ou durante o crescimento em galactose, glicerol ou acetato (Mazur *et al.*, 1995).

Além de proteger a célula, a parede celular promove a interação da mesma com o ambiente através das propriedades de adesão de alguns de seus componentes. O biofilme é um agregado celular, cujo microambiente protetor propicia aos patógenos maior resistência a terapias antimicrobianas (O'Toole *et al.*, 2000). Já foi descrito que *S. cerevisiae* é capaz de formar biofilmes e que essa propriedade é dependente da

glicoproteína de superfície Flo11p (Reynolds e Fink, 2001). Os componentes da parede celular também medeiam a adesão de microrganismos à matriz extracelular, sendo importantes fatores no estabelecimento e evolução da infecção (Lima *et al.*, 2001).

1.6 - Interações proteína-proteína

A imensa quantidade de dados de sequência gerada durante a era genômica fez surgir a necessidade de desenvolvimento de métodos para o estudo funcional de muitos genes e das proteínas por eles codificadas. Devido ao fato de as interações protéicas serem intrínsecas à virtualmente todos os processos celulares, é possível inferir a função de uma proteína através da identificação das proteínas com as quais ela interage (Auerbach *et al.*, 2002). Dessa forma, têm sido constante o desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas que se baseiam em princípios bioquímicos e moleculares para a detecção de interações proteína-proteína (Phizicky e Fields, 1995).

O sistema de duplo-híbrido em levedura (Fields e Song, 1989) baseia-se no fato de que o domínio de ligação ao DNA (BD - *binding domain*) e o domínio de ativação da transcrição (AD - *activation domain*) de fatores de transcrição eucarióticos, como o Gal4p, são separáveis fisicamente e funcionalmente (Keegan *et al.*, 1986). Dessa maneira, estes domínios podem ser clonados separadamente em fusão com as proteínas de interesse, ou seja, aquelas cuja interação se deseja detectar. A construção ocorre de modo a formar dois híbridos: (i) híbrido 1 (BD fusionada a uma das proteínas de interesse, "X"), também chamado de "isca" (BD-X) e híbrido 2 (AD fusionado a outra proteína de interesse, "Y"), também chamado de "presa" (AD-Y). Caso haja interação entre as proteínas, o fator de transcrição é restaurado e a interação pode ser monitorada através da expressão de genes repórteres responsivos ao fator de transcrição, como mostrado na Figura 4. As linhagens de levedura utilizadas possuem mutações em genes requeridos para a biossíntese de aminoácidos (*trp1*, *leu2*, *his3*) e/ou bases nitrogenadas (*ade2*, *ura3*), e os plasmídeos do sistema contêm genes que complementam essas mutações. Dessa forma, é possível detectar as interações nas leveduras transformadas por seleção auxotrófica. Além disso, a mutação no gene *lac*Z, codificante para β-galactosidase, permite a seleção das colônias por coloração.

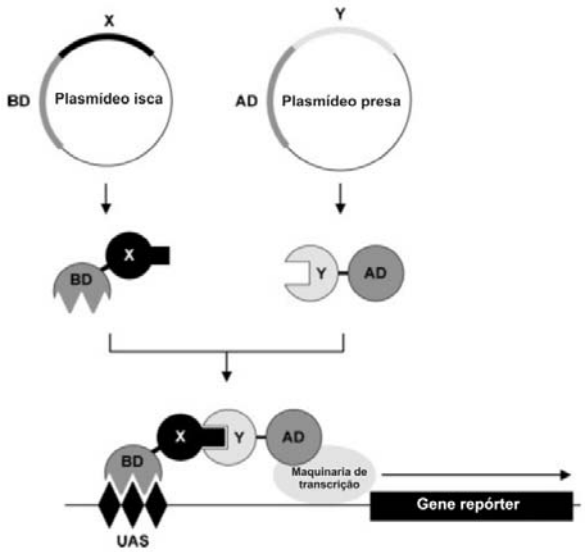

Figura 4 - Princípio do sistema duplo-híbrido em levedura. Após a construção dos híbridos da isca, BD-X, e da presa, BD-Y, os plasmídeos são inseridos em uma mesma linhagem de levedura, ou em linhagens diferentes que irão gerar diplóides. Somente se as proteínas X e Y interagirem fisicamente, os domínios BD e AD ficarão próximos, reconstituindo o fator de transcrição ativo funcionalmente. Este se ligará em sequências de ativação específicas (UAS) nos promotores dos genes repórteres, ativando sua expressão. Adaptação: Causier, 2004.

O sistema duplo híbrido é usado para verificar a interação entre duas proteínas conhecidas ou para o rastreamento de interações de uma biblioteca de duplo-híbrido utilizando-se uma proteína conhecida. O rastreamento pode ser feito através de cotransformação, em que ambos os plasmídeos híbridos são transformados na mesma linhagem, ou por geração de diploidia. Neste último caso são utilizadas duas linhagens haplóides, de tipos sexuais opostos. Um dos tipos é transformado com o híbrido contendo a isca, enquanto as presas são inseridas no outro tipo sexual. Posteriormente, as linhagens transformadas são colocadas no mesmo sistema a fim de gerar diplóides que contenham ambos os híbridos e os ensaios para interações protéicas são conduzidos.

Este sistema tem sido utilizado para o rastreamento de interações proteína-proteína em larga escala em vários organismos, como *S. cerevisiase* (Ito *et al.*, 2001), *Caenorhabditis elegans* (Li *et al.*, 2004) e *Helicobacter pylori* (Rain *et al.*, 2001). Recentemente foi demonstrado através de análises de duplo híbrido que a enzima formamidase de *P. brasiliensis*, envolvida no metabolismo de nitrogênio, interage com Dfg5p, uma glicosil hidrolase da parede celular, com poliubiquitina, proteína quinase C,

proteína ribossomal 40S, calnexina, cisteína protease, isomerase peptidil-prolil e componente enzimático E1 do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase. (Borges *et al.*, 2009). Os autores sugerem que a proteína de parede celular Dfg5p interage com a formamidase na superfície celular do fungo, onde ambas estão localizadas. Além disso, a proteína ribossomal 40S, a isomerase peptidil-prolil e o componente do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase já foram detectados em vesículas extracelulares secretadas por *H. capsulatum* (Albuquerque *et al.*, 2008).

O sistema de duplo híbrido permite a detecção de interações entre proteínas *in vivo*, mesmo que sejam interações fracas e transientes, sendo um método bastante sensível e relativamente barato. Entretanto, podem ocorrer falso-positivos e falso-negativos e interferência estérica por se tratrarem de construções híbridas.

As interações *in vivo* podem ser confirmadas *in vitro* através de ensaios de coimunoprecipitação. Este ensaio bioquímico consiste no uso de anticorpos para detectar a interação entre proteínas (isca e presa) que são expressas fusionadas à epítopos, como c-Myc e Hemaglutinina (HA). Após serem transcritas e traduzidas *in vitro* na presença de metionina radioativa, isca e presa são colocadas no mesmo sistema e, caso haja interação, ambas serão imunoprecipitadas com o anticorpo contra um dos epítopos. Os resultados são visualizados após corrida eletroforética e exposição em filme radiográfico (Figura 5).

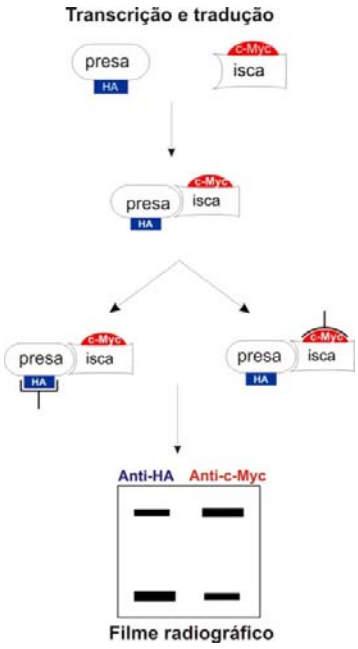

Figura 5 - Princípio da coimunoprecipitação. Após tradução *in vitro*, a interação entre isca e presa pode ser detectada com o uso de anticorpos monoclonais para um dos epítopos (anti-c-Myc ou anti-HA).

Métodos de purificação tradicionais que utilizam ligantes de afinidade têm sido utilizados em combinação com a espectrometria de massas para a detecção de interações entre proteínas (Causier, 2004). O ensaio *in vitro* de *pull-down* associado à glutationa S-transferase (*pull-down* GST) é um exemplo. A proteína de interesse (isca) é fusionada à GST e imobilizada em uma resina de glutationa (GSH), servindo como suporte secundário para possíveis ligantes (presa). Após incubação da isca imobilizada com a fonte de possíveis presas, como lisado celular, os complexos protéicos são analisados por SDS-PAGE e as proteínas identificadas por espectrometria de massas (Figura 6).

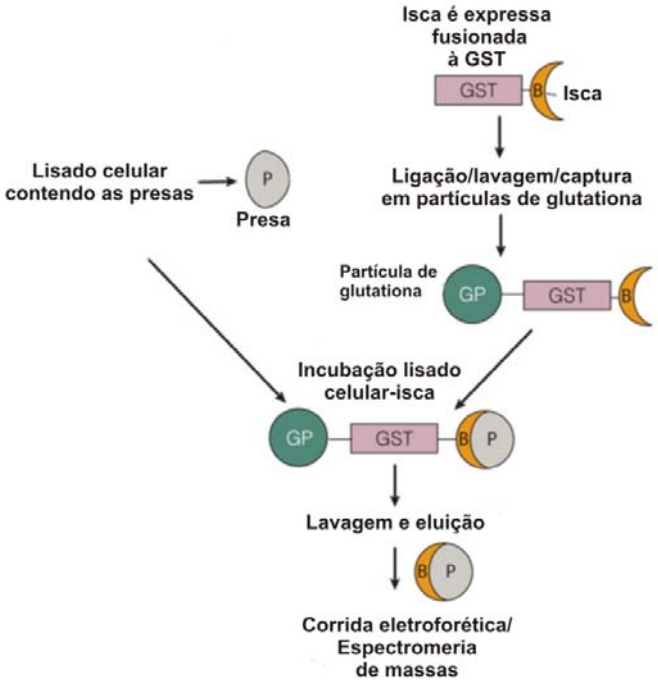

Figura 6 - Digrama esquemático do ensaio de *pull-down* GST *in vitro*. Adaptação: http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00044/Figure1_Promega09042_44949a.jpg.

Enquanto no sistema de duplo-híbrido isca e presa são expressas como híbridos, no ensaio de *pull-down* somente um componente do complexo é expresso como proteína de fusão, minimizando a ocorrência de interferências estéricas. Entretanto, no ensaio de *pull-down* algumas interações podem não ser detectadas devido à baixa afinidade ou baixo nível de expressão dos ligantes.

Devido à suas limitações particulares, todos os métodos citados são complementares, devendo ser aplicados em combinação para produzir mapas de interação proteína-proteína compreensíveis, confiáveis e de alta qualidade. Diante deste

contexto, no presente trabalho utilizou-se a combinação entre duplo-híbrido, associado à coimunoprecipitação, e *pull-down* GST, associado à espectrometria de massas, para averiguar as interações entre Gel3p e proteínas de *P. brasiliensis*.

Justificativa

2 - JUSTIFICATIVA

A dinâmica da parede celular reside no remodelamento constante que esta estrutura sofre em resposta a eventos fisiológicos, como a divisão celular, ou a estresses externos, como variação osmótica ou mudança de temperatura. Essas mudanças são marcadas por variações na distribuição e nas ligações cruzadas entre os componentes da parede, sendo importantes para manter a integridade da célula fúngica no ambiente no qual ela se encontra. No que diz respeito aos fungos patogênicos dimórficos essas modificações definem um passo crucial no processo infectivo: a transição da forma saprobiótica para a parasitária. Essa mudança morfológica permite que o fungo se estabeleça no hospedeiro, adapte-se ao novo ambiente e cause a doença, ou seja, está diretamente relacionada à patogenicidade.

P. brasiliensis é um fungo patogênico dimórfico e, como tal, os fenômenos relacionados à dinâmica da parede celular são muito importantes. Entre outras proteínas relacionadas à síntese e montagem da parede celular de *P. brasiliensis* estão as β-1,3-glicanosiltransferases (Gel1p, Gel2p e Gel3p). A presença de três genes codificantes para proteínas com funções aparentemente redundantes no mesmo organismo gera a necessidade de um estudo mais detalhado no intuito de definir o papel de cada uma. Nesse sentido, o estudo das interações da Gel3p com outras proteínas de *P. brasiliensis* é um modo através do qual funções estabelecidas, bem como novas funções, podem ser caracterizadas.

Objetivos

3 - OBJETIVO GERAL

Identificar e analisar as interações entre a β-1,3-glicanosiltransferase 3 e proteínas de *P. brasiliensis.*

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rastrear interações protéicas através do sistema de duplo-híbrido em *S. cerevisiae*;
- Confirmar os resultados do sistema duplo-híbrido através de experimentos de coimunoprecipitação *in vitro*;
- Buscar interações protéicas através do ensaio de *pull-down* GST;
- Identificar as interações resultantes do ensaio de *pull-down* por espectrometria de massas;
- Interpretar os resultados e compreender os possíveis papéis que as interações desempenham na biologia de *P. brasiliensis*.

Materiais e Métodos

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Fluxograma

O fluxograma dos experimentos realizados no trabalho é apresentado na Figura 7.

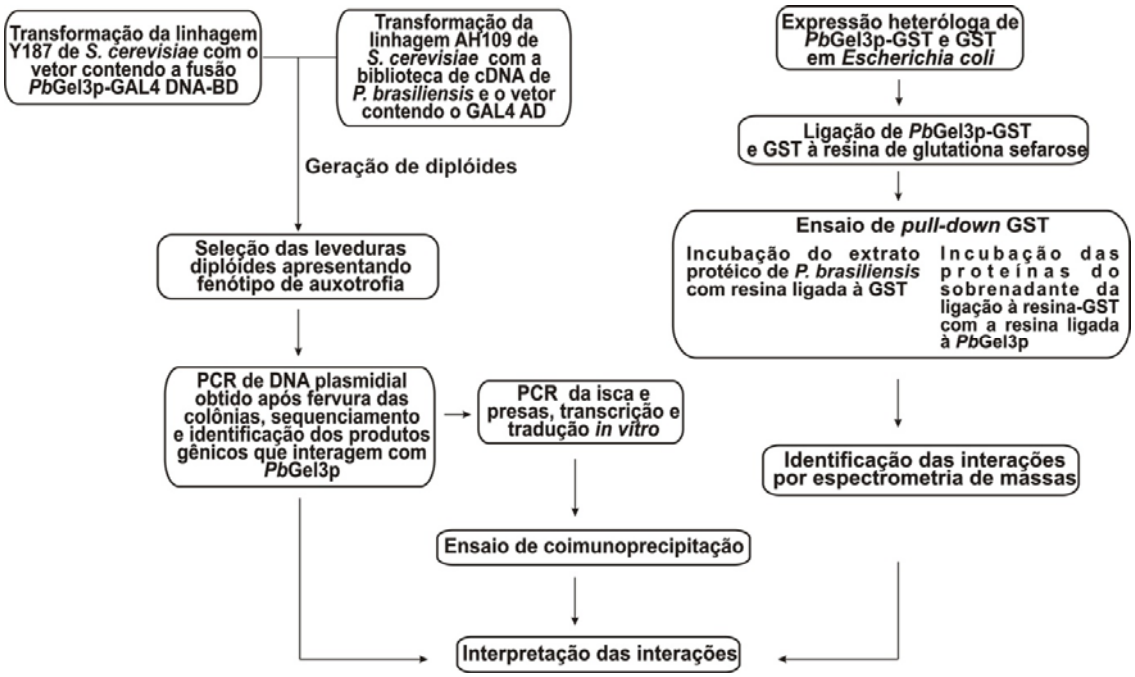

Figura 7 - Fluxograma representativo das estratégias utilizadas durante o trabalho.

4.2 - Isolado do fungo e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado 01 (ATCC-MYA-826) de *P. brasiliensis*. O fungo foi cultivado e mantido em meio de cultura Fava-Netto (Fava-Netto, 1955) na temperatura de 36 °C para a forma de levedura e utilizado após 7 dias de crescimento.

4.3 - Rastreamento de interações protéicas através do sistema de duplo-híbrido

O estudo das interações da Gel3p com outras proteínas de *P. brasiliensis* foi realizado através do sistema duplo-híbrido em *S. cerevisiae*, linhagens AH109 e Y187 (Matchmaker^{TM} Library Construction & Screening Kits - Clontech Laboratories, Inc.). Foi utilizado o cDNA codificante para *Pb*Gel3p (número de acesso no GenBank AY324033) (Castro *et al.*, 2009), já clonado em fase de leitura com o domínio GAL4 de ligação ao DNA (GAL4 DNA-BD) no vetor de expressão pGBKT7, que contém o gene

trp1. O híbrido foi transformado na linhagem Y187, mutada para *trp1*, permitindo a seleção em meio mínimo sem triptofano. Para o rastreamento das interações, foi utilizada uma biblioteca de cDNA construída a partir de RNAs de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Borges *et al.*, 2009). A linhagem AH109, mutada para o gene *leu2*, foi cotransformada com os cDNAs e o vetor de expressão pGADT7-Rec, que contém o gene *leu2*, permitindo seleção em meio mínimo sem leucina. Através de recombinação homóloga *in vivo* os cDNAs foram clonados em fase de leitura com o domínio GAL4 de ativação transcricional presente no pGADT7-Rec (GAL4 AD). O rastreamento das interações foi feito através da geração de diploidia. As linhagens Y187 e AH109, transformadas com os híbridos, foram inoculadas em um mesmo sistema para a geração de leveduras diplóides. Posteriormente, os diplóides foram selecionados em meio mínimo na ausência de triptofano, leucina e histidina (TDO - *Triple Dropout Medium*), no qual foi testada a ativação do gene repórter *his3*. A fim de aumentar a estringência da seleção, esses clones foram replicados em meio mínimo sem triptofano, leucina, histidina e adenina (QDO - *Quadruple Dropout Medium*), para testar a ativação do gene *ade2*. A composição dos meios TDO e QDO é mostrada na Tabela 1. O rastreamento de clones positivos foi concluído com o teste de ativação do gene repórter *mel1*, codificante para a enzima α-galactosidase. Na presença do substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-galactopiranosídeo (X-α-Gal) as colônias positivas tornam-se azuis.

Tabela1. Meio mínimo TDO* e QDO**

YNB (fonte de nitrogênio)	6,7 g
Solução de aminoácidos 10X	100 ml
Solução 40% glicose	50 ml
Ágar	12 g
H2O milli Q q.s.p	1.000 ml

*: solução de aminoácidos sem triptofano, leucina e histidina.

**: solução de aminoácidos sem triptofano, leucina, histidina e adenina.

Como controle positivo, foram utilizados os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-RecT, que expressam os híbridos GAL4 DNA-BD e p53 de murino, e GAL4 AD e o antígeno T do vírus SV40, respectivamente. É descrito que p53 e o antígeno T interagem em ensaio de duplo-híbrido. Para controle negativo utilizou-se o vetor

pGBKT7-Lam, que expressa uma fusão entre GAL4 DNA-BD e lamina C humana, que não interage nem forma complexos com a maioria das outras proteínas.

4.3.1 - Análise das interações positivas

Os cassetes correspondentes às presas foram obtidos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o DNA plasmidial das leveduras diplóides selecionadas em meio mínimo, de acordo com instruções do sistema comercial (Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits - Clontech Laboratories, Inc.). Foram utilizados os oligonucleotídeos AD 5'(5'–CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCC–3') e AD 3' (5'–GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT–3') nas reações de amplificação compostas por 30 ciclos nas seguintes condições: 94 ^{o}C por 2 min; 94 ^{o}C por 30 seg; 55 ^{o}C por 1 min; 72 ^{o}C por 2 min e 15 seg e 72 ^{o}C por 7 min.

O DNA resultante da amplificação foi sequenciado automaticamente no aparelho MegaBACE 1000 (GE Healtcare®) utilizando-se o sistema comercial DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBACE™). As sequências obtidas foram processadas através da nomeação de bases, utilizando-se o programa Phred (Ewing *et al.*, 1998) e da edição para a remoção de nucleotídeos do vetor, utilizando-se o programa Crossmatch (http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/Swat.cfm). Posteriormente, as sequências foram agrupadas utilizando-se o programa CAP3 (Huang e Madan, 1999). Em seguida, foram realizadas pesquisas de similaridade das sequências no banco de dados do GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org), utilizando-se o algorítimo BlastX (*Basic local alignment search tool*) (Altschul *et al.*, 1990).

4.4 - Ensaios de coimunoprecipitação *in vitro*

Os vetores de expressão utilizados no sistema de duplo híbrido, pGBKT7 e pGADT7-Rec, possuem promotores para T7 RNA polimerase e os epítopos c-Myc e Hemaglutinina (HA), respectivamente. Os cassetes para produção da isca e das presas foram obtidos por PCR com o DNA plasmidial das leveduras diplóides. Para obtenção do cassete de expressão de *Pb*Gel3p foram utilizados os oligonucleotídeos BD 5' (5'–GGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCG–3') e BD 3' (5'–CGCCCGGAATTAGCTTGGCTGCAAGCG–3') e os oligonucleotídeos AD 5' e AD 3' foram utilizados na obtenção dos cassetes de expressão das presas, como descrito

(Matchmaker CO-IP - Clontech Laboratories, Inc.). Os produtos de PCR foram utilizados como molde para transcrição e tradução *in vitro*, de acordo com o sistema TnT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega), na presença de ^{35}S-Metionina (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). O controle positivo da reação foi feito através do ensaio de atividade da luciferase. Após a tradução, uma alíquota de 5µl de cada amostra foi submetida à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 12%, cuja composição é mostrada na Tabela 2. O gel foi tratado com solução fixadora (50% metanol, 10% ácido acético glacial, 40% água) e antes da secagem foi colocado em solução contendo 7% de ácido acético, 7% de metanol e 1% de glicerol, para evitar a quebra. Posteriormente à secagem, o gel foi exposto a filme de raios X para análise dos produtos traduzidos.

Tabela 2. Gel de poliacrilamida 12%

Acrilamida:bis-acrilamida (39:1)	4,6 ml
2,0 M Tris-HCl pH 8,8	3 ml
Água bidestilada	6,8 ml
20 % SDS *	0,39 ml
10 % PA **	0,06 ml
TEMED ***	0,012 ml

*: dodecil sulfato de sódio

**: persulfato de amônio

***: tetrametiletilenodiamina

Posteriormente, *Pb*Gel3p fusionada ao epítopo c-Myc foi incubada à temperatura ambiente por 1 h com algumas proteínas da biblioteca de duplo-híbrido, fusionadas ao epítopo HA. Após incubação com o anticorpo monoclonal anti-c-Myc e com esferas de proteína A, as amostras foram centrigufadas e submetidas a sucessivas lavagens. Em seguida, as proteínas foram desnaturadas por meio de fervura e submetidas à eletroforese em gel desnaturante e posterior exposição a filme de raio-X, de acordo com o sistema Matchmaker CO-IP (Clontech Laboratories, Inc.).

Como controle positivo, foram utilizados os mesmos plasmídeos do ensaio de duplo-híbrido, pGBKT7-53 e pGADT7-RecT. O vetor pGBKT7-53 expressa p53 de murino fusionada ao epítopo c-Myc, enquanto pGADT7-RecT expressa o antígeno T fusionado ao epítopo HA. O antígeno T e p53 também se associam *in vitro*. No controle

negativo as proteínas da biblioteca fusionadas ao epítopo HA foram incubadas somente com o anticorpo anti-c-Myc, sem *Pb*Gel3p.

4.5 - Análise de interações protéicas através do ensaio de *pull-down* GST

4.5.1 - Preparação do extrato de proteínas de *P. brasiliensis*

Após 3 dias de cultivo em meio Fava-Netto líquido, as células leveduriformes foram lavadas com tampão Tris-cálcio (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2mM $CaCl_2$) e centrifugadas a 2.000 *g* por 5 min a 4ºC . Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram congeladas e maceradas na presença de nitrogênio líquido, utilizando-se gral e pistilo, até a completa pulverização celular. O material foi transferido para um tubo cônico acrescido de tampão Tris-cálcio contendo inibidores de proteases (Protease Inhibitor mix 100X, Amersham). Após agitação em vórtex por 20 min a 4 ºC, o material foi centrifugado a 20.000 *g* por 15 min e o sobrenadante armazenado a -80 ^{o}C.

A concentração de proteínas do extrato bruto total foi determinada segundo o método descrito por Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina bovina sérica (BSA) como padrão.

4.5.2 - Expressão heteróloga e solubilização de *Pb*Gel3p

Para produção da proteína recombinante foi utilizado o cDNA codificante para *Pb*Gel3p (Castro *et al.*, 2009), clonado no vetor de expressão pGEX-4-T3 (GE Healthcare®). A bactéria *E. coli* (BL21 Star™(DE3)pLysS, Invitrogen) foi transformada com a construção pGEX-*Pb*Gel3p através de choque térmico. As células transformadas foram crescidas em meio líquido Luria-Bertani (LB) contendo 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol. A cultura foi incubada a 20 ^{o}C sob agitação até atingir a densidade óptica (D.O.) entre 0,5 e 0,7, quando foi adicionado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,1 mM. As células foram então incubadas a 15 ^{o}C por 16 h sob agitação e centrifugadas a 2.000 *g* por 10 min. O sedimento foi ressuspendido em tampão fosfato salina (PBS 1X - 0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,3) e congelado por 15 min a -80 ^{o}C, sendo descongelado em seguida em banho-maria a 37 ^{o}C. As células foram submetidas a 22 ciclos de sonicação de 30 s com intervalo de 2 min em desruptor de células ultra-sônico, com potência de 100 Watts. Após a solubilização, o extrato celular foi

centrifugado e alíquotas do sedimento e do sobrenadante foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), seguida por coloração com azul de *Coomassie*.

Todos os procedimentos citados acima foram realizados com *E. coli* transformada somente com o vetor pGEX-4-T3, sem inserto, a fim de expressar somente a GST. Nesse caso, a solubilização foi feita com 15 ciclos de sonicação no desruptor de células. A expressão da GST nas mesmas condições foi feita como controle para o ensaio de *pull-down*.

4.5.3 - Ligação da *Pb*Gel3p-GST e GST à resina de glutationa

Após a solubilização, *Pb*Gel3p-GST e GST foram ligadas à resina Glutathione Sepharose 4B™ (GE Healthcare®). Para a ligação, foram utilizados 6 ml do extrato celular do clone contendo *Pb*Gel3p fusionada à GST e 200 µl de resina, assim como 1,5 ml do extrato celular do clone contendo a GST com 50 µl de resina. A ligação foi realizada a 4 ^{o}C por 40 min, sob agitação branda (Agitador Horizontal INSIGHT). Posteriormente, a resina ligada à *Pb*Gel3p foi lavada 30 vezes com PBS 1X a 37 ^{o}C e a resina ligada à GST foi lavada 5 vezes. Após ressuspensão das resinas em PBS 1X, alíquotas foram retiradas, fervidas por 7 min e as proteínas do sobrenadante foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), seguida por coloração com azul de *Coomassie*. O fragmento correspondente à *Pb*Gel3p fusionada à GST foi removido do gel para identificação por espectrometria de massas.

4.5.4 - Ensaio de *pull-down* com *Pb*Gel3p fusionada à GST

O sobrenadante do extrato protéico de *P. brasiliensis* foi descongelado e 2,5 ml foram incubados com 10 µl da resina ligada à GST por 2 h a 4 ^{o}C sob agitação suave em tubo cônico de 15 ml. A resina foi centrifugada a 200 *g* por 5 min e o sobrenadante colocado em outro tubo contendo 50 µl da resina ligada à *Pb*Gel3p. Essa mistura foi incubada por 3 h a 4 ^{o}C, sob agitação. Após esse período, a resina foi centrifugada a 200 *g* por 5 min, lavada 4 vezes com PBS 1X gelado e ressuspendida em tampão de amostra 2X para proteína (0,2 M Tris-HCl pH 6.8, 0,4% SDS, 20% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). Da mesma forma, foi lavada a resina ligada à GST, resultante da primeira ligação com o extrato protéico de *P. brasiliensis*. Ambas as resinas foram fervidas durante 7 min e as proteínas do sobrenadante submetidas à SDS-

PAGE em gel de poliacrilamida 12%, seguida por coloração com *Coomassie* PhastGel™ Blue R (GE Healthcare®) por 16 h. Após esse período, o gel foi descorado e as proteínas foram removidas para posterior análise por espectrometria de massas. A massa molecular de cada proteína foi calculada através do método de regressão linear e, para o valor da massa molecular obtida experimentalmente, foi admitido um erro de até 20% em relação à massa teórica.

A passagem do extrato protéico de *P. brasiliensis* pela resina ligada à GST foi feita no intuito de eliminar as interações inespecíficas, ou seja, aquelas proteínas que interagem com a GST e não com *Pb*Gel3p.

4.5.5 - Digestão tríptica e análise de peptídeos por espectrometria de massas

A digestão das proteínas *in gel* foi feita como descrito (Winters *et al.*, 2008). As proteínas resultantes do ensaio de *pull-down* foram removidas do gel cujos pedaços foram fragmentados, colocados em tubos Axygen de 0,5 ml e lavados com 100 µl de água milli-Q. Os pedaços de gel foram incubados por 5 min em 100 µl de acetonitrila e secos sob vácuo. Em seguida, foram adicionados 30 µl de solução 10 mM de ditiotreitol (DTT)/25 mM de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3); a amostra foi mantida sob agitação e posteriormente incubada a 56°C por 1 h. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 30 µl de 55 mM iodocetamida. Os pedaços de géis foram agitados e, em seguida, mantidos por 45 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O sobrenadante foi retirado e as amostras lavadas com 100 µl de 25 mM NH_4HCO através de agitação. O sobrenadante foi removido, os pedaços de gel foram desidratados com 100 µl de solução contendo 25 mM NH_4HCO em 50% de acetonitrila, sob agitação durante 5 min. Esta lavagem foi repetida. O sobrenadante foi retirado e os pedaços de gel foram secos sob vácuo. Posteriormente, foram adicionados 30 µl de solução de tripsina 10 ng/ml e os pedaços de gel foram reidratados no gelo a 4 °C por 10 min. O excesso de tripsina foi retirado; foram adicionados 25 µl de 25 mM NH_4HCO e as amostras foram incubadas por 16 h à 37°C. O excesso de 25 mM NH_4HCO foi retirado e colocado em tubos novos. Foram adicionados 50 µl de solução 50% acetonitrila/5% de ácido trifluoroacético (TFA) aos pedaços de géis que foram agitados por 10 min. As amostras foram submetidas a 3 ciclos de 1 min, cada um, de sonicação. As etapas de adição de acetonitrila/TFA e de sonicação foram repetidas 2 vezes e, a cada repetição, o

sobrenadante foi combinado à solução transferida para tubos novos. Posteriormente, essa solução foi seca sob vácuo e ressuspendida em 5 µl de água milli-Q.

Os peptídeos resultantes da digestão foram utilizados para produção de espectros de massas por MALDI-TOF-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight-Mass Spectrometer* - Dessorção de Matriz Assistida por Laser-Tempo-de-Vôo-Espectrômetro de Massas) no aparelho MALDI-Synapt MS™ (Waters®). Os dados obtidos foram utilizados na busca de proteínas no banco de dados não redundante de proteína do NCBI através do software MASCOT (http://www.matrixscience.com/). As proteínas foram identificadas através da impressão digital de massas de peptídeos (*Peptide Mass Fingerprint* - PMF), considerando até uma clivagem tríptica perdida, 100 ppm de erro de massa entre as massas teórica e experimental e metionina oxidada como modificação variável decorrente do processo de digestão *in gel*.

Resultados

5 - RESULTADOS

5.1 - Rastreamento de interações protéicas através do ensaio de duplo-híbrido

Com o objetivo de se identificar proteínas que interagem com *Pb*Gel3p, o ensaio de duplo-híbrido em *S. cerevisiae* foi utilizado inicialmente para rastrear interações protéicas em uma biblioteca de duplo-híbrido. Após a transformação das linhagens Y187 e AH109 de *S. cerevisiae* com os plasmídeos contendo a isca (*Pbgel3*) e as presas (cDNAs da biblioteca de duplo-híbrido), o rastreamento foi realizado, gerando 70 diplóides que cresceram no meio seletivo, como visualizado na Figura 8.

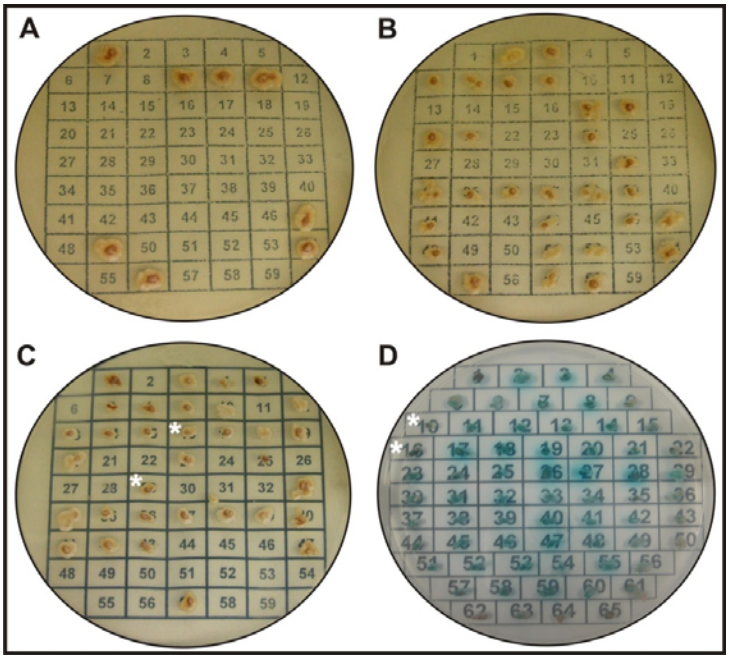

Figura 8 - Seleção de leveduras diplóides apresentando interações protéicas. **(A, B e C)** Após o cruzamento das linhagens que receberam os híbridos isca-GAL4 DNA-BD e presa-GAL4 AD, leveduras diplóides foram selecionadas em meio QDO através da ativação dos genes repórteres *his3* e *ade2*. **(D)** As colônias foram replicadas em meio QDO contendo X-α-gal e tornaram-se azuis devido à ativação do gene repórter *mel1*, que codifica para a α-galactosidase. Os controles positivo e negativo foram feitos como descrito em materiais e métodos. (*: diplóides cujas interações foram confirmadas por coimunoprecipitação)

No intuito de se identificar os genes cujos produtos interagem com *Pb*Gel3p, os cassetes correspondentes às presas da biblioteca de duplo-híbrido foram obtidos por PCR com o DNA plasmidial das leveduras diplóides selecionadas no meio mínimo

QDO. O DNA resultante da amplificação foi sequenciado e após o processamento, 27 sequências foram rejeitadas devido ao tamanho (menor que 75 pares de bases) ou à baixa qualidade das bases nitrogenadas (Phred menor que 20). As 43 sequências restantes foram distribuídas em 2 agrupamentos com mais de uma sequência (*contigs*) e em 10 sequências que não se agruparam (*singlets*).

A pesquisa de similaridade de sequências através do blastX no banco de dados do GenBank, o qual inclui os dados do genoma de *P. brasiliensis,* gerou os dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Produtos gênicos resultantes do rastreamento de interações através do sistema de duplo-híbrido

Produtos gênicos	Organismo/número de acesso	Valor de E	Redundância
Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase its3	*P. brasiliensi*/EEH34952	2e-12	31
Fator de transcrição Ctf1Bp	*P. brasiliensis*/EEH37972	2e-83	2
Dsk1p proteína quinase	*P. brasiliensis*/EEH39143	9e-33	1
5'-3' exoribonuclease	*P. brasiliensis*/EEH40013	5e-90	1
Serina esterase/lipase*	*P. brasiliensis*/EEH39053	3e-66	1
Proteína de resistência a leptomicina B Pmd1p	*P. brasiliensis*/EEH36917	4e-38	1
RNA helicase dependente de ATP Dbp5p*	*P. brasiliensis*/EEH41859	4e-35	1
3-oxoacil redutase	*P. brasiliensis*/EEH35088	1e-16	1
Proteína hipotética conservada	*P. brasiliensis*/EEH49628	1e-32	1
Proteína hipotética conservada	*P. brasiliensis*/EEH34498	2e-33	1
Proteína hipotética conservada	*P. brasiliensis*/EEH39736	2e-31	1
Proteína predita	*Ajellomyces capsulatus*/EEH02693	2e-17	1

*: interações confirmadas por coimunoprecipitação

5.2 - Confirmação das interações rastreadas por meio de reação de coimunoprecipitação

Algumas interações positivas resultantes do rastreamento *in vivo* foram confirmadas *in vitro* através de coimunoprecipitação. Inicialmente, o cassete para produção das proteínas (isca e presas) foi obtido por PCR com DNA plasmidial das leveduras diplóides, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos BD 5' - BD 3' e AD 5' - AD 3'. Os cassetes foram transcritos e traduzidos *in vitro* na presença de ^{35}S-Metionina. A síntese resultou em uma proteína de 60 kDa, correspondente a *Pb*Gel3p, e em dois peptídeos de 47 e 39 kDa, que correspondem a serina esterase/lipase e RNA

helicase dependente de ATP Dbp5p, respectivamente (Figura 9A, linhas 2 e 3). Em seguida, os produtos traduzidos, isca fusionada ao epítopo c-Myc e presa fusionada ao epítopo HA, foram coimunoprecipitados utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-C-Myc. As interações confirmadas *in vitro* foram *Pb*Gel3p-serina esterase/lipase e *Pb*Gel3p-RNA helicase dependente de ATP Dbp5p, como mostrado na Figura 9B (linhas 1 e 4).

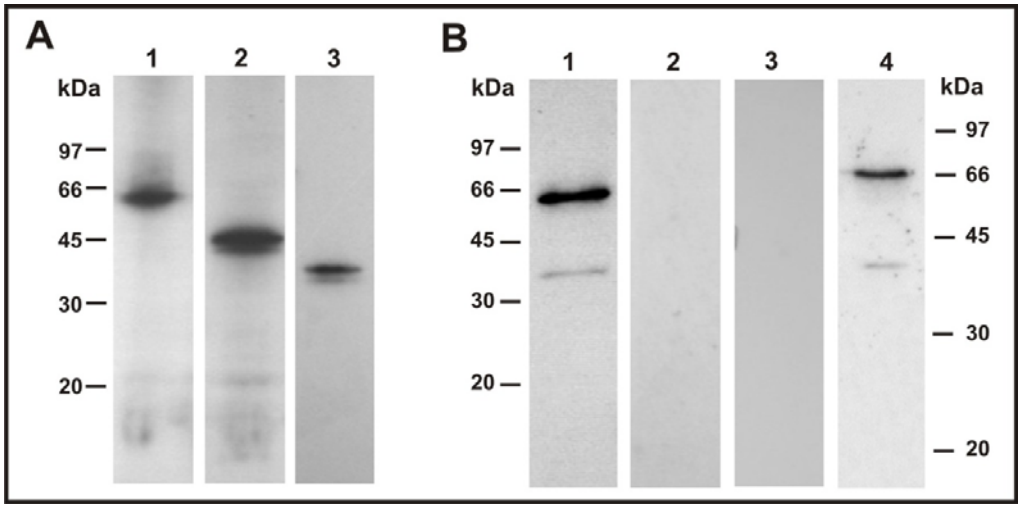

Figura 9 - Tradução *in vitro* e confirmação da interação entre *Pb*Gel3p e duas proteínas da biblioteca de duplo híbrido. **(A)** Autoradiografia das proteínas traduzidas *in vitro*: *Pb*Gel3p (1), serina esterase/lipase (2) e RNA helicase dependente de ATP Dbp5p (3). **(B)** Coimunoprecipitação da serina esterase/lipase (fragmento inferior) com *Pb*Gel3p (linha 1) e da RNA helicase dependente de ATP Dbp5p (fragmento inferior) com *Pb*Gel3p (linha 4). As linhas 2 e 3 correspondem aos controles negativos das reações das linhas 1 e 4, respectivamente.

5.3 - Busca de interações através do ensaio de *pull-down* GST *in vitro*

A utilização de mais de uma técnica para o rastreamento de interações proteína-proteína aumenta as possibilidades de detectar mais interações, sejam elas confirmatórias ou não. Dessa maneira, o ensaio de *pull-down* GST, associado à espectrometria de massas, também foi utilizado na busca de interações entre *Pb*Gel3p e proteínas de *P. brasiliensis*.

Inicialmente, *Pb*Gel3p foi expressa fusionada à GST, solubilizada e ligada à resina de glutationa. Da mesma forma e para fins de controle, a GST foi também expressa e ligada à resina. Após a ligação e análise por SDS-PAGE, a fusão *Pb*Gel3p-

GST de 83 kDa (57 kDa da Gel3p + 26 kDa da GST) e a GST (26 kDa) foram visualizadas (Figura 10A, linhas 1 e 2). A proteína de fusão de 83 kDa (Figura 10A, linha 1) foi submetida à digestão tríptica e posterior análise por espectrometria de massas, sendo confirmada a identidade de *Pb*Gel3p (Tabela 4). Posteriormente, foi realizado o ensaio de *pull-down* GST, no qual o extrato protéico de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi incubado inicialmente com a GST ligada à resina de glutationa e, em seguida, com *Pb*Gel3p também ligada à resina. Após a análise por SDS-PAGE e comparação do perfil protéico gerado pela incubação com GST e com *Pb*Gel3p, uma proteína de 70 kDa (Figura 10B, linha 2) foi submetida à digestão tríptica e análise por espectrometria de massas. Foi identificada a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de *P. brasiliensis* (Tabela 4). A presença exclusiva dessa proteína no perfil protéico gerado após a incubação do extrato com *Pb*Gel3p ligada à resina sugere que HSP70 realmente interage com *Pb*Gel3p, não sendo uma interação inespecífica com a GST.

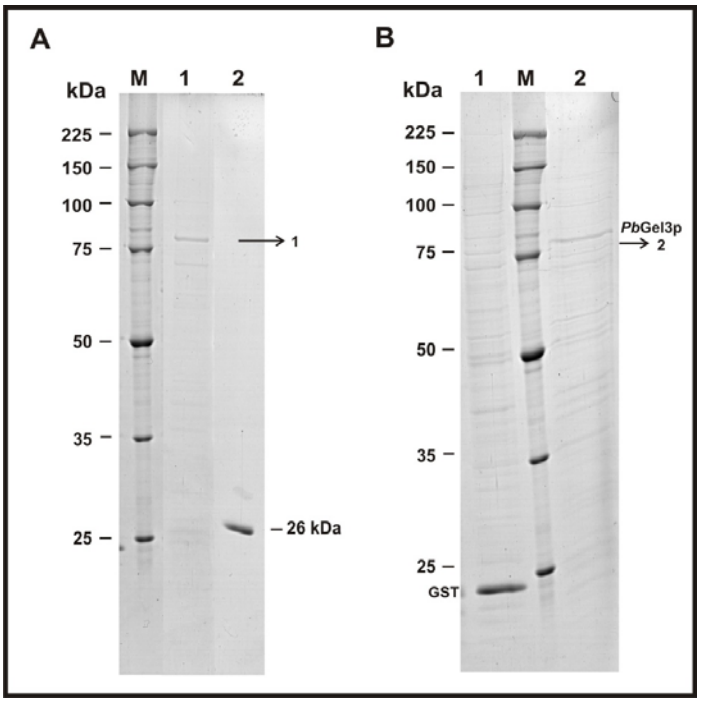

Figura 10 - Ligação à resina de glutationa e *pull-down* GST de *Pb*Gel3p. (A) Análise em SDS-PAGE, seguida por coloração com azul de *Coomassie*, da ligação de *Pb*Gel3p (linha 1) e GST (linha 2) à resina glutationa sefarose. **(B)** Análise por SDS-PAGE do ensaio de *pull-down* GST. A linha 1 corresponde à ligação do extrato protéico de *P. brasiliensis* à GST ligada à resina. A linha 2 mostra o perfil protéico gerado após incubação do extrato com *Pb*Gel3p ligada à resina, que inclui a HSP70 de *P. brasiliensis* (2), identificada após análise por espectrometria de massas.

Tabela 4. Proteínas identificadas a partir do gel unidimensional mostrado na Figura 10.

Número do fragmento no gel*	Proteína identificada	Número de acesso	Número de peptídeos encontrados	Score MASCOT (p<0,05)	Cobertura (%)	Massa molecular teórica (Da)	Massa molecular determinada experimentalmente (Da)
1	β-1,3-glicanosiltransferase 3 [*Paracoccidioides brasiliensis*]	AAP91684	35	80	57	57.884	81.600+
2	Proteína de choque térmico de 70 kDa [*Paracoccidioides brasiliensis*]	AAK66771	32	95	50	70.977	78.000

* : Figura 10

+ : Massa molecular considerando 26 kDa da cauda GST

Discussão

6 - DISCUSSÃO

A parede celular é a primeira interface entre a célula fúngica e o ambiente extracelular, sendo uma estrutura altamente dinâmica que desempenha funções em um grande número de processos celulares importantes. Ao mesmo tempo em que fornece força mecânica à célula, a parede celular mantém a plasticidade necessária para o crescimento e divisão celulares. Essas características são, em sua maioria, resultado da ação coordenada das proteínas presentes na parede que exercem funções estruturais e/ou catalíticas relacionadas à (i) montagem de macromoléculas, (ii) ao remodelamento da parede durante o crescimento e a morfogênese, (iii) à facilitação da captação de nutrientes e (iv) à adaptação da célula à diferentes ambientes. As β-1,3-glicanosiltransferases são proteínas GPI-ancoradas que participam da montagem da parede celular através do alongamento do principal componente dessa estrutura, o polissacarídeo β-1,3-glicana.

A análise funcional de Gel3p de *P. brasiliensis* através da sua capacidade de recuperar o fenótipo do mutante Δ*gas1* de *S. cerevisiae* demonstrou que essa enzima participa ativamente na biossíntese e morfogênese da parede celular do fungo (Castro *et al.*, 2009). No entanto, a presença de dois outros genes codificantes para β-1,3-glicanosiltransferases (Gel1p e Gel2p) no genoma de *P. brasiliensis* sugere que essas proteínas podem desempenhar outras funções, relacionadas ou não à parede celular, na célula fúngica. A habilidade de uma proteína em desempenhar mais de uma função na célula tem sido descrita para várias espécies. São as proteínas denominadas *moonlighting*, termo que se refere à multifuncionalidade dessas moléculas, na qual duas ou mais diferentes funções são exercidas por uma cadeia polipeptídica (Jeffery, 2005). Essas diferentes funções podem ser desempenhadas dependendo da localização da proteína como, por exemplo, no exterior da célula ou dentro de uma organela, ou da ligação com outros polipeptídeos, através da formação de complexos protéicos ou da interação com outra proteína, formando um heterodímero. Dessa forma, os métodos desenvolvidos para detecção de interações proteína-proteína são muito úteis na busca de novas funções.

No intuito de identificar interações entre *Pb*Gel3p e outras proteínas de *P. brasiliensis* foram utilizadas duas metodologias que, devido a suas características particulares, são complementares. O uso combinado de diferentes ensaios aumenta a

confiabilidade dos resultados e a possibilidade de identificação de um número maior de proteínas. As interações estabelecidas podem sugerir funções para *Pb*Gel3p em outras vias assim como funções para as proteínas identificadas na parede celular.

Através do rastreamento de interações realizado com o ensaio de duplo-híbrido foram identificadas 12 proteínas, entre as quais 4 não possuem função descrita. As demais são em sua maioria enzimas, as quais desempenham funções em diferentes processos celulares. Após o sequenciamento dos cDNAs recuperados da biblioteca de duplo-híbrido de *P. brasiliensis* e análises de bioinformática, a sequência codificante para o produto gênico fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase its3 (Pip5kp) foi a que apresentou maior redundância. Pip5kp é uma enzima da classe das transferases que catalisa a formação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), um fosfolipídeo de inositol (ou fosfoinositídeo). A formação do produto se dá através da transferência de um grupo fosfato para o carbono 5 do anel inositol do fosfatidilinositol-4-fosfato.

Os fosfoinositídeos possuem funções importantes na transdução de sinal em eucariotos, sendo seu papel conservado de levedura a células de mamíferos. O PIP_2 é um componente de grande importância na sinalização por fosfoinositídeos. Essa molécula é a fonte de dois importantes segundo mensageiros, o inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG), gerados após hidrólise pela fosfolipase C (Berridge e Irvine, 1984). O IP_3 induz a liberação de íons cálcio de reservas intracelulares, como vacúolos em *S. cerevisiae* (Belde *et al.*, 1993), enquanto o DAG ativa a proteína quinase C. A ação combinada desses dois eventos controla outros processos celulares (Berridge, 1987).

Genes que codificam produtos com atividade de Pip5kp já foram descritos em *S. cerevisiae* (Homma *et al.*, 1998), *Schizosaccharomyces pombe* (Zhang *et al.*, 2000) e *C. albicans* (Hairfield *et al.*, 2002). Em *S. pombe* essa enzima é codificada pelo gene *its3* e está associada perifericamente à membrana plasmática através de interações iônicas (Vancurova *et al.*, 1999). O mutante para o gene *its3* foi isolado após um rastreamento feito no intuito de identificar genes que compartilham funções com a calcineurina, uma proteína sinalizadora altamente conservada que participa da resposta à perturbações na parede celular em *A. fumigatus* (Zhang *et al.*, 2000; Steinbach *et al.*, 2007). Na presença de um inibidor de calcineurina e à temperatura de 33 ^{o}C, o mutante Δ*its3* apresentou uma desorganização acentuada dos fragmentos de actina e citocinese incompleta. Esse fato sugere que a Pip5kp de *S. pombe* atua de forma coordenada com a calcineurina e

desempenha um papel chave na citocinese, o qual depende de sua localização na membrana plasmática (Zhang *et al.*, 2000). A relação da via da calcineurina com a parede celular foi demonstrada recentemente em *A. fumigatus*. Linhagens deletadas para o genes *cnaA*, codificante para calcineurina, e *crz*A, codificante para o fator de transcrição que é defosforilado pela calcineurina, apresentaram diminuição no conteúdo de β-1,3-glicana na parede celular (Fortwendel *et al.*, 2009). Já foi descrito, também, que o mutante Δ*its3* é sensível ao antifúngico micafungina, um inibidor da β-1,3-glicana sintase, sugerindo um defeito na integridade da parede celular. De forma consistente, o mutante duplo para o gene *its3* e o gene codificante para β-1,3-glicana sintase foi inviável. No mutante Δ*its3* houve perda de localização dessa enzima, não sendo observada sua presença nas extremidades da célula (Deng *et al.*, 2005).

Assim como em *S. pombe*, a enzima Pip5kp também está associada à membrana plasmática em *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Em *S. cerevisiae* ela é codificada pelo gene *mss4* que, quando mutado, gera fenótipos similares àqueles observados em mutantes para proteínas que se ligam à actina. As características incluem tamanho celular aumentado, formato arredondado da célula e distribuição randômica dos fragmentos de actina, os quais apresentam distribuição polarizada para o broto na levedura selvagem. Tais fenômenos ocorrem à temperatura de 23 ^{o}C, sendo significativamente acentuados à 38 ^{o}C. Esses dados demonstram que Mss4p está envolvida no estabelecimento da morfologia celular (Homma *et al.*, 1998), fato que pode ser atribuído à sua função relacionada a actina. Tor2p é uma fosfatidilinositol quinase putativa que controla a organização do citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 1997). Já foi descrito que Mss4p restaura a organização da actina em um mutante Δ*tor2*. Além disso, no mutante Δ*mss4* submetido a uma mudança de temperatura de 24 para 37 ^{o}C os monômeros de actina estão distribuídos randomicamente e não é possível visualizar filamentos formados por essa proteína. Isso evidencia que Mss4p é requerida para a organização do citoesqueleto de actina (Desrivières *et al.*, 1998).

As mudanças relacionadas ao citoesqueleto de actina são explicadas pelo fato de o PIP_2, produto da Pip5kp, funcionar como um regulador de proteínas que se ligam à actina. Para que um filamento de actina não sofra rápida despolimerização dentro da célula quando seu crescimento é interrompido, uma proteína de capeamento é ligada à sua extremidade positiva ("mais"). Esta ligação reduz enormemente tanto a taxa de crescimento quanto a taxa de despolimerização do filamento. Em resposta a sinais

extracelulares, ocorre um aumento de PIP_2 que promove a eliminação do capeamento da extremidade positiva através da dissociação das proteínas capeadoras, como gelsolina e CapZ (Janmey e Stossel, 1987; Caldwell *et al.*, 1989). Esse processo faz com que a extremidade positiva fique disponível para o crescimento, promovendo a polimerização do filamento.

Esses rearranjos no citoesqueleto de actina ocorrem em resposta a sinais desencadeados por proteínas da família Rho. Essas proteínas são pequenas GTPases que se tornam ativas após a ligação de GTP. Durante a transdução de sinal, ligam-se a moléculas efetoras responsáveis por desencadear cascatas de sinalização que promovem várias respostas celulares, como mudanças no citoesqueleto a estímulos externos (Bustelo *et al.*, 2007). Como o PIP_2 também está envolvido na reorganização da actina, a possível relação entre as proteínas da família Rho e Pip5kps foi investigada. Estudos demonstraram que a proteína Rho, da família das Rho GTPases, regula a atividade de uma Pip5kp em células de mamíferos (Chong *et al.*, 1994). Além disso, Rho e Rac1, outro membro da família das GTPases, interagem fisicamente com Pip5kp (Tolias *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1996), sugerindo que os efeitos da transdução de sinal mediada por proteínas Rho sobre o citoesqueleto de actina são mediados pelas Pip5kp, através da produção de PIP_2.

A interação entre *Pb*Gel3p e a Pip5kp fornece indícios de que, além da função de glicanosiltransferase, a enzima Gel3p pode estar envolvida nos mecanismos de rearranjo do citoesqueleto de actina em *P. brasiliensis* e, consequentemente, nos eventos do ciclo de divisão celular. Além da membrana plasmática, a atividade de Pip5kp já foi detectada no RE (Helms *et al.*, 1991). Como *Pb*Gel3p é uma proteína de superfície, ela é conduzida para seu destino através da via secretória, a qual inclui o RE. Dessa forma, a interação entre *Pb*Gel3p e Pip5kp pode ocorrer nas proximidades da membrana plasmática ou no interior do RE.

O envolvimento de *Pb*Gel3p nos eventos do ciclo de divisão celular também pode ser justificado pela sua interação com a Dsk1 proteína quinase. Em *S. pombe* o gene codificante para essa enzima, *dsk1,* foi originalmente identificado por restaurar o fenótipo de mutantes *dis1* sensíveis a baixas temperaturas (Takeuchi e Yanagida, 1993). Tais mutantes exibem um defeito característico na mitose. À temperatura restritiva (20 ^{o}C), os cromossomos condensam e o fuso é formado e alongado, mas não há separação das cromátides irmãs (Ohkura *et al.*, 1988). Dsk1p é uma fosfoproteína cuja fosforilação

e localização dentro da célula estão relacionadas com a progressão do ciclo celular. Durante a intérfase localiza-se no citoplasma e, na mitose, autofosforila-se e é encontrada no núcleo. Essa localização nuclear permite a progressão e término da mitose, motivo pelo qual o gene *dsk1* restaura o fenótipo de mutantes *dis1*. Dessa forma, Dsk1p participa do controle mitótico alterando sua própria localização celular (Takeuchi e Yanagida, 1993).

Dsk1p é uma quinase que fosforila especificamente proteínas que contêm repetições serina/arginina (SR) (Tang *et al.*, 1998). Essas proteínas compreendem fatores que participam do processamento de pré-RNAm dentro da célula e a fosforilação de seus domínios SR é necessária para que o processamento ocorra. Evidências indicam que as interações entre tais fatores são facilitadas após a fosforilação que, ao mesmo tempo, previne interações não específicas com o RNA (Xiao e Manley, 1997). Assim como a maioria dos processos celulares, o processamento de RNA após a transcrição deve ser regulado coordenadamente com a progressão do ciclo celular. Durante a mitose, quando a transcrição é reprimida, não há processamento. Já na intérfase, quando ocorre o crescimento celular, vários precursores de RNAm são produzidos e a maquinaria de processamento deve estar ativa (Misteli e Spector, 1997). Dessa maneira, Dsk1p está intimamente relacionada com o ciclo de divisão celular, desempenhando duas funções: na progressão da mitose e na coordenação do processamento de pré-RNAm através da fosforilação de fatores contendo domínios SR (Takeuchi e Yanagida, 1993; Tang *et al.*, 1998).

A interação com a Pip5kp e com a Dsk1p reforça os indícios de que *Pb*Gel3p está, de alguma forma, envolvida nos eventos do ciclo celular. Pelo fato de Pip5kp participar do rearranjo do citoesqueleto de actina, através da síntese do PIP_2, e Dsk1p estar diretamente relacionada com a progressão da mitose, Gel3p deve participar dessa fase do ciclo celular em *P. brasiliensis*.

Outra proteína identificada no rastreamento por duplo-híbrido foi a RNA helicase dependente de ATP Dbp5p, cuja interação com *Pb*Gel3p foi confirmada por coimunoprecipitação. Esta enzima é um membro da família das proteínas que contêm o motivo DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), conhecida como família DBP (DEAD *box proteins*). As proteínas dessa família são helicases que desempenham papéis importantes no metabolismo de RNA e, nas células eucarióticas, estão envolvidas no processamento de

pré-RNAm, exportação de RNAm do núcleo, biogênese de ribossomos e iniciação da tradução (Linder, 2006).

Em *S. cerevisiae*, Dbp5p está localizada no citoplasma e concentra-se ao redor do envelope nuclear. Em leveduras nas quais o gene codificante para essa proteína, *dbp5*, é mutado há um rápido acúmulo de RNAm no núcleo, indicando que Dbp5p é essencial para a exportação de RNAm do núcleo para o citoplasma (Tseng *et al.*, 1998). Análises sobre a distribuição intracelular de Dbp5p indicaram sua associação com o complexo poro nuclear, corroborando seu papel na exportação de RNAm (Snay-Hodge *et al.*, 1998). As moléculas de RNAm são exportadas para o citosol em associação com proteínas que contêm sinais para exportação nuclear (Michael *et al.*, 1995). Um exemplo é a proteína Nab2 de *S. cerevisiae* que se move entre o núcleo e o citoplasma e acompanha o RNAm através do complexo poro nuclear (Green *et al.*, 2002). Já foi descrito que Dbp5p é responsável por separar Nab2p do RNAm ao qual ela se liga *in vitro*. Além disso, foi demonstrado *in vivo* que Nab2p é um substrato de Dbp5p e que a dissociação de Nab2p do RNAm é requerida para a exportação eficiente dessa molécula (Tran *et al.*, 2007).

Outra proteína que participa da exportação de RNAm em *S. cerevisiae* é a Npl3. Esta proteína associa-se com o RNAm no núcleo e o transporta para o citoplasma, voltando em seguida para o núcleo para um novo ciclo de exportação (Lee *et al.*, 1996). A fosforilação de Nlp3p *in vivo* pela quinase citoplasmática Sky1p promove a dissociação de Nlp3p da molécula de RNAm no citoplasma e é necessária para a localização nuclear de Nlp3p (Gilbert *et al.*, 2001). Sky1p é homóloga à quinase Dsk1p, que interagiu *in vivo* com *Pb*Gel3p pelo ensaio de duplo híbrido e que fosforila, em *S. pombe*, fatores envolvidos no processamento de RNAm no núcleo. Como Dbp5p e Dsk1p estão envolvidas no metabolismo de RNA e ambas interagem com *Pb*Gel3p, sugere-se que esta glicanosiltransferase também esteja envolvida nesse processo.

Recentemente foi descrito que Dbp5p está envolvida no controle da síntese protéica localizada na extremidade do brotamento durante a mitose em *S. cerevisiae* (Goldfarb, 2009). Durante a divisão celular, fatores que se ligam ao RNAm, como a Nab2p, acompanham os transcritos para os sítios nos quais eles serão traduzidos, como a extremidade dos brotamentos em levedura (van den Bogaart *et al.*, 2009). Ao atingir a extremidade do broto o complexo Nab2p-RNAm é desfeito pela ação da Dbp5p, que está ancorada à extremidade do brotamento através de mecanismos ainda

desconhecidos. Esse processo resulta, então, na síntese protéica localizada na extremidade do novo brotamento (Goldfarb, 2009). Dessa forma, a interação com Dbp5p gera indícios de que *Pb*Gel3p pode estar envolvida na formação de brotamentos em células leveduriformes de *P. brasiliensis*, processo no qual acontecem vários rearranjos na parede celular. Ademais, uma RNA helicase dependente de ATP, uma proteína relacionada ao processamento de pré-RNAm, outra relacionada à exportação de RNAm e a β-1,3-glicanosiltransferase 3 de *H. capsulatum* estão entre os componentes protéicos das vesículas secretadas por esse organismo (Albuquerque *et al.*, 2008), fato que fortalece a possibilidade de interação entre essas proteínas.

A interação com a 5'-3' exoribonuclease, identificada no ensaio de duplo híbrido, reforça o fato de que *Pb*Gel3p pode estar envolvida no metabolismo de RNA. Em *S. cerevesiae* o gene codificante para a 5'-3' exoribonuclease Rat1p, cuja função na exportação de RNAm não é óbvia, foi identificado em um rastreamento de leveduras mutantes que apresentavam acúmulo de RNAm no núcleo. O gene foi isolado, caracterizado e descrito como essencial para o transporte núcleo-citoplasmático de RNAm. Foi proposto que Rat1p associa-se ao RNAm durante a transcrição, catalisando a separação do transcrito do DNA molde, e permanece ligada ao ácido ribonucléico durante seu deslocamento para a periferia do núcleo, desempenhando um papel essencial ao longo desta via (Amberg *et al.*, 1992).

A síntese da âncora GPI e sua posterior adição às proteínas de superfície GPI ancoradas ocorre no RE. Esse fato pode explicar a interação entre *Pb*Gel3p e a proteína serina esterase/lipase, identificada no rastreamento de duplo-híbrido e cuja interação foi confirmada *in vitro* através do ensaio de coimunoprecipitação. No RE, a via de biossíntese da âncora GPI consiste em, pelo menos, 10 reações enzimáticas ao final das quais a âncora é transferida para as proteínas que possuem um sinal de adição de âncora GPI na extremidade C-terminal (Kinoshita e Inoue, 2000). Essas proteínas também são sintetizadas no RE e transportadas dessa organela para a superfície celular através do Golgi. Como mostrado na Figura 2, a fosfoetanolamina constitui uma ponte entre o glicolipídeo da âncora GPI e a proteína ancorada sendo, por consequência, um componente indispensável dessa estrutura. Estudos realizados com o protozoário *Trypanosoma brucei*, no qual proteínas GPI-ancoradas são abundantes, demonstraram que o fluoreto de fenilmetanosulfonil, um inibidor de serina esterase, inibibe a incorporação de fosfoetanolamina no precursor da âncora GPI. Esse composto inibe a

adição de fosfoetanolamina tanto em sistema de membranas celulares como em células intactas, nas quais a incorporação é inibida em 90% (Masterson e Ferguson, 1991). Assim, a enzima serina esterase catalisa um dos últimos passos na síntese da âncora GPI, a transferência da fosfoetanolamina para o precursor. Dessa forma, é coerente dizer que *Pb*Gel3p, a qual é sintetizada e recebe a âncora GPI no RE, interage fisicamente com a serina esterase, que participa da síntese da âncora e está presente no lúmen do RE.

O rastreamento de interações através do sistema duplo híbrido também resultou na identificação da proteína de resistência a leptomicina B Pmd1p. Em *S. pombe* a sequência de aminoácidos de Pmd1p é muito similar às glicoproteínas P de mamíferos, codificadas por genes de resistência à drogas (Nishi *et al.*, 1992). As glicoproteínas P são bombas de efluxo de drogas dependentes de energia associadas à membrana plasmática (Hrycyna, 2001). Pmd1p é membro da superfamília de transportadores de membrana ABC (*ATP binding cassette*) que utilizam a energia de hidrólise do ATP para o transporte de moléculas através da membrana (Davidson *et al.*, 2008). A interação de Pmd1p com *Pb*Gel3p pode ser explicada pela localização de ambas na superfície celular e pode relacionar *Pb*Gel3p com a resposta celular, a nível de parede, à agentes antifúngicos.

A proteína 3-oxoacil redutase e o fator de transcrição Ctf1Bp , identificados pelo ensaio de duplo-híbrido, estão envolvidos no metabolismo de lipídeos. Em *S. cerevisiae* a enzima 3-oxoacil redutase participa da via mitocondrial de biossíntese de ácido graxo, que fornece ácidos graxos requeridos para o remodelamento ou reparo de fosfolipídeos (Schneider *et al.*, 1997). A via mitocondrial para a síntese de ácidos graxos é altamente conservada em eucariotos e completamente independente do aparato citosólico para a síntese dessas moléculas. Recentemente foi descrito que a ausência de qualquer enzima desta via resulta no processamento inecifiente de RNAs transportadores mitocondriais (Schonauer *et al.*, 2008).

O fator de transcrição Ctf1Bp regula o catabolismo de ácidos graxos em fungos. A deprivação de fontes de carbono é uma das condições de estresse às quais microrganismos patogênicos estão submetidos no hospedeiro. Assim, vias necessárias para a utilização de fontes de carbono alternativas, como a β-oxidação, são requeridas para o sucesso do processo infectivo. Tais vias são reguladas por vários fatores e, em *C. albicans* o fator de transcrição Ctf1p é requerido na expressão de genes necessários para

a β-oxidação e para o crescimento em meio contendo lipídeos como fonte de carbono (Ramirez e Lorenz, 2009). Da mesma forma, o homólogo de Ctf1p em *Aspergillus nidulans*, FarBp, também controla o catabolismo de ácidos graxos nesse organismo (Hynes *et al.*, 2006). A interação com a proteína 3-oxoacil redutase e com o fator de transcrição Ctf1Bp indica que *Pb*Gel3p pode estar relacionada ao metabolismo de lipídeos em *P. brasiliensis*. Em leveduras recuperadas do fígado de camundongos infectados com *P. brasiliensis* há um aumento na biossíntese de lipídeos assim como remodelamento da membrana celular (Costa *et al.*, 2007). O tratamento com plasma humano induz a expressão de genes codificantes para enzimas da via de degradação de ácidos graxos (Bailão *et al.*, 2007). Além disso, a enzima 3-oxoacil redutase já foi identificada no transcritoma de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica de micélio para levedura, indicando que o anabolismo de ácidos graxos ocorre durante esse processo. *Pb*Gel3p pode desempenhar algum papel no remodelamento da membrana plasmática frente à condições de estresse ou durante o crescimento vegetativo do fungo.

O ensaio de *pull-down* GST *in vitro* resultou na identificação da HSP70 de *P. brasiliensis*. As proteínas de choque térmico participam da resposta a estresses ambientais, como elevação da temperatura, em vários organismos. Desempenham o papel de chaperonas moleculares ligando-se a outras proteínas e auxiliando seu enovelamento correto. Além disso, ajudam a prevenir agregações protéicas indesejadas e auxiliam no transporte de proteínas através de membranas dentro da célula (Walter e Buchner, 2002; Borges e Ramos, 2005). Fungos dimórficos patogênicos expostos ao ambiente do hospedeiro adaptam-se aos estresses químicos e térmicos impostos, através da diferenciação celular para a forma parasitária, bem como através da expressão diferencial de proteínas, entre as quais estão as proteínas de choque térmico. Em *P. brasiliensis,* essas proteínas já foram detectadas como sendo diferencialmente reguladas após o aumento de temperatura, ou indução da fase leveduriforme (Goldman *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2005) e os genes codificantes para HSP60 e para outro membro da família HSP70 já foram caracterizados (Silva *et al.*, 1999; Izacc *et al.*, 2001). Foi descrito que o gene codificante para este outro membro da família HSP70 é diferencialmente expresso durante a transição dimórfica ocorrendo um progressivo aumento na sua expressão durante o período de conversão de micélio para levedura (Silva *et al.*, 1999).

Proteínas de choque térmico também têm sido descritas como elicitadoras da resposta imune humoral e celular contra vários patógenos, os quais incluem os fungos (Zügel e Kaufmann, 1999). Em *H. capsulatum*, um membro da família HSP70 participa da resposta imune mediada por células na histoplasmose, apesar de não induzir resposta protetora contra a micose (Allendoerfer *et al.*, 1996). Já foi demonstrado que soros de pacientes com paracoccidioidomicose reagiram com a HSP70 recombinante, sugerindo um papel imunológico para esta proteína no processo infeccioso causado por *P. brasiliensis* (Bisio *et al.*, 2005). Ademais, estudos evidenciaram a presença da HSP70 e de outras proteínas de choque térmico em vesículas secretadas por *H. capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). Em *C. albicans* uma proteína da família HSP70 foi identificada como uma proteína atípica do proteoma da parede celular (Castillo *et al.*, 2008). A interação com a HSP70 sugere que *Pb*Gel3p pode participar da resposta ao estresse.

As interações entre *Pb*Gel3p e proteínas da superfície celular são interpretadas mais facilmente, enquanto as interações com proteínas citosólicas e, portanto, não óbvias, geram discussões mais aprofundadas. Entretanto, a existência das proteínas *moonlighting* torna essas interpretações um pouco menos complicadas. Um bom exemplo é a proteína Tsa1p que está envolvida no estresse oxidativo e na biogênese da parede celular em *C. albicans*. Em hifas, essa proteína localiza-se na parede celular enquanto em células leveduriformes ela permanece no citosol e no núcleo (Urban *et al.*, 2005). A Tabela 5 sumariza as possíveis interações adicionais de *Pb*Gel3p, como sugerido pelos ensaios de interações intermoleculares.

Tabela 5. Funções adicionais preditas de *Pb*Gel3p, além do remodelamento da parede celular

Função predita pelos ensaios de interações	Proteína identificada na interação com função similar	Referências
Ciclo celular	Pip5kp	Zhang *et al*., 2000
	Dsk1p	Takeuchi e Yanagida, 1993
Síntese da âncora GPI	Serina esterase/lipase	Masterson e Fegurson, 1991
Metabolismo de RNAm	Dbp5p	Tseng *et al*., 1998
	5'-3' exoribonuclease	Amberg *et al*., 1992
Resposta a agentes antifúngicos	Pmd1p	Nishi *et al*., 1992
Resposta ao estresse	HSP70	Silva *et al*., 1999
Metabolismo de lipídeos	Ctf1p	Ramirez e Lorenz, 2009
	3-oxoacil redutase	Schneider *et al*., 1997

Complicadas ou não, estas interpretações e especulações sobre os diferentes papéis que *Pb*Gel3p pode desempenhar em *P. brasiliensis* devem ser embasadas através de estudos funcionais que corroborem sua participação em outros processos celulares, que não o remodelamento da parede celular. A partir daí poderá ser dito se *Pb*Gel3p é uma proteína *moonlighting*, ou seja, se desempenha funções diferentes dentro da mesma célula. O fato é que a idéia de um gene-uma proteína-uma função tem se tornado muito simples, pois para um número crescente de proteínas estão sendo atribuídas duas ou mais funções diferentes.

Conclusões

7 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que:

- O ensaio de duplo-híbrido *in vivo* e o ensaio de *pull-down* GST *in vitro* foram utilizados com sucesso na identificação de proteínas de *P. brasiliensis* que interagem com *Pb*Gel3p.

- No rastreamento de interações através do sistema duplo-híbrido em *S. cerevisiae* foram identificadas 8 proteínas com função descrita, das quais 2 interações foram confirmadas por ensaios de coimunoprecipitação, e 4 proteínas hipotéticas.

- A interação de *Pb*Gel3p com as quinases Pip5kp e Dsk1p sugere uma função para *Pb*Gel3p no ciclo de divisão celular, no qual ambas estão envolvidas. A participação de *Pb*Gel3p no metabolismo de RNAm é sugerida devido sua interação com duas proteínas relacionadas à esse processo (Dbp5p e 5'-3' exoribonuclease), e a interação com o fator de transcrição Ctf1Bp e a 3-oxoacil redutase sugere o envolvimento de *Pb*Gel3p no metabolismo de lipídeos.

- A presença de algumas proteínas homólogas àquelas identificadas nos ensaios de interação em vesículas secretadas por outros fungos patogênicos sugere que a interação das proteínas identificadas com *Pb*Gel3p ocorre na superfície celular.

- No ensaio de *pull-down* GST foi identificada a proteína de choque térmico de 70 kDa, fato que sugere o envolvimento de *Pb*Gel3p na resposta ao estresse.

- Estudos funcionais são necessários para validar as funções adicionais preditas da Gel3p em *P. brasiliensis*.

Perspectivas

8 - PERSPECTIVAS

- Imunolocalização celular das proteínas identificadas nos ensaios de interação a fim de verificar a colocalização com *Pb*Gel3p.

- Identificação dos domínios protéicos de *Pb*Ge3p e das proteínas identificadas envolvidos na interação através de espectrometria de massas.

- Geração de mutantes para *Pb*Gel3p e análise dos fenótipos relacionados às funções adicionais preditas para essa proteína.

Bibliografia

9 - BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Uscanga, B. e Francois, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37(3): 268-74.

Ajello, L. e Polonelli, L. (1985). Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. *Eur J Epidemiol* 1(3): 160-5.

Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancope-Oliveira, R. M., Almeida, I. C. e Nosanchuk, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* 10(8): 1695-710.

Allendoerfer, R., Maresca, B. e Deepe, G. S., Jr. (1996). Cellular immune responses to recombinant heat shock protein 70 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 64(10): 4123-8.

Almeida, A. J., Matute, D. R., Carmona, J. A., Martins, M., Torres, I., McEwen, J. G., Restrepo, A., Leao, C., Ludovico, P. e Rodrigues, F. (2007). Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol* 44(1): 25-31.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. e Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-10.

Amberg, D. C., Goldstein, A. L. e Cole, C. N. (1992). Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* 6(7): 1173-89.

Anjos, A. R., Calvi, S. A., Ferracini, R., Peracoli, M. T., Silva, C. L. e Soares, A. M. (2002). Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol* 40(4): 377-82.

Aristizabal, B. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A. e Restrepo, A. (1998). Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun* 66(11): 5587-91.

Arroyo, J., Sarfati, J., Baixench, M. T., Ragni, E., Guillen, M., Rodriguez-Pena, J. M., Popolo, L. e Latge, J. P. (2007). The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. *Yeast* 24(4): 289-96.

Auerbach, D., Thaminy, S., Hottiger, M. O. e Stagljar, I. (2002). The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. *Proteomics* 2(6): 611-23.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C. e Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-51.

Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K. I., Alquati, S., Miyaji, M., de Camargo, Z. P., Gomes, G. M., Franco, M. e Montenegro, M. R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58(4): 505-12.

Bailão, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. e Soares, C. M. A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 43-57.

Barbosa, M. S., Bao, S. N., Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Feitosa, L. S., Mendes-Giannini, M. J. e Soares, C. M. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74(1): 382-9.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. e Soares, C. M. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7: 29.

Batista, W. L., Matsuo, A. L., Ganiko, L., Barros, T. F., Veiga, T. R., Freymuller, E. e Puccia, R. (2006). The *Pb*MDJ1 gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermodimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell* 5(2): 379-90.

Beauvais, A., Drake, R., Ng, K., Diaquin, M. e Latge, J. P. (1993). Characterization of the 1,3-beta-glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. *J Gen Microbiol* 139(12): 3071-8.

Belde, P. J., Vossen, J. H., Borst-Pauwels, G. W. e Theuvenet, A. P. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 323(1-2): 113-8.

Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56: 159-93.

Berridge, M. J. e Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312(5992): 315-21.

Bisio, L. C., Silva, S. P., Pereira, I. S., Xavier, M. A., Venancio, E. J., Puccia, R., Soares, C. M. e Felipe, M. S. (2005). A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. *Med Mycol* 43(6): 495-503.

Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P. e Blondin, B. (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol* 179(15): 4929-36.

Borelli, D. (1964). Concepto de Reservárea. La reducida reservárea de la paracoccidioidosis. *Dermat Venez* 4: 71-74.

Borges, C. L., Parente, J. A., Barbosa, M. S., Santana, J. M., Bao, S. N., Sousa, M. V. e Soares, A. M. (2009). Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. *FEMS Yeast Res in press*.

Borges, J. C. e Ramos, C. H. (2005). Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept Lett* 12(3): 257-61.

Bowman, S. M., Piwowar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J. e Free, S. J. (2006). Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 5(3): 587-600.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

Brummer, E., Castaneda, E. e Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6(2): 89-117.

Bustelo, X. R., Sauzeau, V. e Berenjeno, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions *in vivo*. *Bioessays* 29(4): 356-70.

Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B. e Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* 276(23): 19679-82.

Caldwell, J. E., Heiss, S. G., Mermall, V. e Cooper, J. A. (1989). Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* 28(21): 8506-14.

Camargo, Z. P. e Franco, M. F. (2000). Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 17: 41-48

Cano, M. I., Cisalpino, P. S., Galindo, I., Ramirez, J. L., Mortara, R. A. e da Silveira, J. F. (1998). Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 36(3): 742-7.

Caracuel, Z., Martinez-Rocha, A. L., Di Pietro, A., Madrid, M. P. e Roncero, M. I. (2005). *Fusarium oxysporum* gas1 encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* 18(11): 1140-7.

Carbonell, L. M. e Rodriguez, J. (1968). Mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*: an electron microscope study. *J Bacteriol* 96(2): 533-43.

Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H. e Klis, F. M. (1997). *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae. Yeast* 13(15): 1477-89.

Carotti, C., Ragni, E., Palomares, O., Gissi, C., Latge, J., Fontaine, T. e Popolo, L. (2006). A Cys-enriched domain related to a novel plant carbohydrate-binding module is essential for the glucan-transferase activity of a Phr/Gel/Gas protein subfamily. *8th Conference on Candida and Candidiasis*, Washington, DC, American Society for Microbiology.

Carrero, L. L., Nino-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J., Soares, C. M., Pereira, M., Jesuino, R. S., McEwen, J. G., Mendoza, L., Taylor, J. W., Felipe, M. S. e San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 45(5): 605-12.

Castillo, L., Calvo, E., Martinez, A. I., Ruiz-Herrera, J., Valentin, E., Lopez, J. A. e Sentandreu, R. (2008). A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. *Proteomics* 8(18): 3871-81.

Castro, N. S., de Castro, K. P., Orlandi, I., Feitosa Ldos, S., Rosa e Silva, L. K., Vainstein, M. H., Bao, S. N., Vai, M. e Soares, C. M. (2009). Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Yeast Res* 9(1): 103-14.

Castro, N. S., Maia, Z. A., Pereira, M. e Soares, C. M. (2005). Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* 4(2): 326-45.

Causier, B. (2004). Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 23(5): 350-67.

Chikamori, T., Saka, S., Nagano, H., Saeki, S., Lacaz Cda, S., Rodrigues, M. C., Cassaguerra, C. M. e Braccialli, M. L. (1984). Paracoccidioidomycosis in Japan. Report of a case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 26(5): 267-71.

Chong, L. D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G. M. e Schwartz, M. A. (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79(3): 507-13.

Conti-Diaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49(2): 131-4.

Corredor, G. G., Peralta, L. A., Castano, J. H., Zuluaga, J. S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A. M., Matute, D. R., McEwen, J. G. e Restrepo, A. (2005). The naked-tailed armadillo Cabassous centralis (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 43(3): 275-80.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. e Soares, C. M. (2007). Transcriptome

profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153(Pt 12): 4194-207.

Coutinho, P. M. e Henrissat, B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. **Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering**. Gilbert, H. J., Davics, G., Henrissat, B. and Svensson, B. Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry**:** 3-12.

Coutinho, Z. F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R. M., Sabroza, P. C. e Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica* 18(5): 1441-54.

Dallies, N., Francois, J. e Paquet, V. (1998). A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(14): 1297-306.

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. e Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(2): 317-64, table of contents.

De Bernardis, F., Muhlschlegel, F. A., Cassone, A. e Fonzi, W. A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 66(7): 3317-25.

Delgado, N., Xue, J., Yu, J. J., Hung, C. Y. e Cole, G. T. (2003). A recombinant beta-1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. *Infect Immun* 71(6): 3010-9.

Deng, L., Sugiura, R., Ohta, K., Tada, K., Suzuki, M., Hirata, M., Nakamura, S., Shuntoh, H. e Kuno, T. (2005). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase regulates fission yeast cell integrity through a phospholipase C-mediated protein kinase C-independent pathway. *J Biol Chem* 280(30): 27561-8.

Desrivières, S., Cooke, F. T., Parker, P. J. e Hall, M. N. (1998). MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(25): 15787-93.

Eisenhaber, B., Bork, P. e Eisenhaber, F. (1998). Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11(12): 1155-61.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. e Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8(3): 175-85.

Fava-Netto, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq Cir Clin Exp* 18: 197-254.

Feitosa, L. S., Cisalpino, P. S., Santos, M. R., Mortara, R. A., Barros, T. F., Morais, F. V., Puccia, R., Silveira, J. F. e Camargo, Z. P. (2003). Chromosomal polymorphism,

syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 39(1): 60-9.

Fields, S. e Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230): 245-6.

Firon, A., Lesage, G. e Bussey, H. (2004). Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr Opin Microbiol* 7(6): 617-23.

Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. e Latge, J. P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 275(52): 41528.

Fonzi, W. A. (1999). PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* 181(22): 7070-9.

Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Pinchai, N., Perfect, B. Z., Alspaugh, J. A., Perfect, J. R. e Steinbach, W. J. (2009). Differential effects of inhibiting chitin and 1,3-{beta}-D-glucan synthesis in ras and calcineurin mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2): 476-82.

Gemmill, T. R. e Trimble, R. B. (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* 1426(2): 227-37.

Gilbert, W., Siebel, C. W. e Guthrie, C. (2001). Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *Rna* 7(2): 302-13.

Goldfarb, D. S. (2009). How to grow a bud: an importin acts in asymmetric division. *Nat Cell Biol* 11(3): 243-5.

Goldman, G. H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Ferreira, L. E., Moreira, J. C., Bogossian, A. P., Tekaia, F., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G. e Goldman, M. H. (2003). Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* 2(1): 34-48.

Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X. e Corbett, A. H. (2002). Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem* 277(10): 7752-60.

Guo, B., Styles, C. A., Feng, Q. e Fink, G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12158-63.

Hairfield, M. L., Westwater, C. e Dolan, J. W. (2002). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity is stimulated during temperature-induced morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology* 148(Pt 6): 1737-46.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M. e Kitada, K. (1998). Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(41): 26946-53.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. e Kitada, K. (1999). Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* 181(13): 3886-9.

Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeaupuis, J. P., Simenel, C., Delepierre, M. e Latge, J. P. (1996). A novel beta-1,3-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 271(43): 26843-9.

Helms, J. B., de Vries, K. J. e Wirtz, K. W. (1991). Synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the endoplasmic reticulum of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 266(32): 21368-74.

Homma, K., Terui, S., Minemura, M., Qadota, H., Anraku, Y., Kanaho, Y. e Ohya, Y. (1998). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J Biol Chem* 273(25): 15779-86.

Hrycyna, C. A. (2001). Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance. *Semin Cell Dev Biol* 12(3): 247-56.

Huang, X. e Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9(9): 868-77.

Hung, C. Y., Yu, J. J., Seshan, K. R., Reichard, U. e Cole, G. T. (2002). A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infect Immun* 70(7): 3443-56.

Hurtado-Guerrero, R., Schuttelkopf, A. W., Mouyna, I., Ibrahim, A. F., Shepherd, S., Fontaine, T., Latge, J. P. e van Aalten, D. M. (2009). Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. *J Biol Chem* 284(13): 8461-9.

Hynes, M. J., Murray, S. L., Duncan, A., Khew, G. S. e Davis, M. A. (2006). Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5(5): 794-805.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. e Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8): 4569-74.

Izacc, S. M., Gomez, F. J., Jesuino, R. S., Fonseca, C. A., Felipe, M. S., Deepe, G. S. e Soares, C. M. (2001). Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 39(5): 445-55.

Janmey, P. A. e Stossel, T. P. (1987). Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 325(6102): 362-4.

Jeffery, C. J. (2005). Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrom Rev* 24(6): 772-82.

Joseph, E. A., Mare, A. e Irving, W. R., Jr. (1966). Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 21(6): 732-7.

Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I. e Yamamura, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 110(1): 208-18.

Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Moreno, R. E. e Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 97(3): 1036-41.

Keegan, L., Gill, G. e Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231(4739): 699-704.

Kinoshita, T. e Inoue, N. (2000). Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphos-phatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 4(6): 632-8.

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. e Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26(3): 239-56.

Koch, M. R. e Pillus, L. (2009). The glucanosyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(27): 11224-9.

Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W. e Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-3)-glucan. *J Biol Chem* 270(3): 1170-8.

Lacaz, C. S. (1994). Historical evolution of the knowledge on Paracoccidioidomycosis and its etiological agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. **Paracoccidioidomycosis**. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G. London, CRC Press**:** 1-7.

Latge, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66(2): 279-90.

Leclerc, M. C., Philippe, H. e Gueho, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol* 32(5): 331-41.

Lee, M. S., Henry, M. e Silver, P. A. (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev* 10(10): 1233-46.

Lesage, G. e Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(2): 317-43.

Li, S., Armstrong, C. M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P. O., Han, J. D., Chesneau, A., Hao, T., Goldberg, D. S., Li, N., Martinez, M., Rual, J. F., Lamesch, P., Xu, L., Tewari, M., Wong, S. L., Zhang, L. V., Berriz, G. F., Jacotot, L., Vaglio, P., Reboul, J., Hirozane-Kishikawa, T., Li, Q., Gabel, H. W., Elewa, A., Baumgartner, B., Rose, D. J., Yu, H., Bosak, S., Sequerra, R., Fraser, A., Mango, S. E., Saxton, W. M., Strome, S., Van Den Heuvel, S., Piano, F., Vandenhaute, J., Sardet, C., Gerstein, M., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K. C., Harper, J. W., Cusick, M. E., Roth, F. P., Hill, D. E. e Vidal, M. (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303(5657): 540-3.

Lima, O. C., Figueiredo, C. C., Previato, J. O., Mendonca-Previato, L., Morandi, V. e Lopes Bezerra, L. M. (2001). Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun* 69(11): 6874-80.

Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* 34(15): 4168-80.

Lu, C. F., Kurjan, J. e Lipke, P. N. (1994). A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol Cell Biol* 14(7): 4825-33.

Manners, D. J., Masson, A. J. e Patterson, J. C. (1973). The structure of a beta-1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J* 135(1): 19-30.

Manocha, M. S. (1980). Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelial forms. *Sabouraudia* 18(4): 281-6.

Masterson, W. J. e Ferguson, M. A. (1991). Phenylmethanesulphonyl fluoride inhibits GPI anchor biosynthesis in the African trypanosome. *Embo J* 10(8): 2041-5.

Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J. T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G. e Taylor, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23(1): 65-73.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. e Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15(10): 5671-81.

McEwen, J. G., Bedoya, V., Patino, M. M., Salazar, M. E. e Restrepo, A. (1987a). Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25(3): 165-75.

McEwen, J. G., Restrepo, B. I., Salazar, M. E. e Restrepo, A. (1987b). Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J Med Vet Mycol* 25(5): 343-5.

Michael, W. M., Siomi, H., Choi, M., Pinol-Roma, S., Nakielny, S., Liu, Q. e Dreyfuss, G. (1995). Signal sequences that target nuclear import and nuclear export of pré-mRNA-binding proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60: 663-8.

Misteli, T. e Spector, D. L. (1997). Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trends Cell Biol* 7(4): 135-8.

Montenegro, M. R., Franco, M. (1994). Pathology. **Paracoccidioidomycosis**. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G. London, CRC Press**:** 131-149.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. e Latge, J. P. (2000a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* 275(20): 14882-9.

Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B. e Latge, J. P. (2000b). Identification of the catalytic residues of the first family of beta-(1,3)-glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochem J* 347 Pt 3: 741-7.

Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Lechenne, B., Fontaine, T., Beauvais, A., Sarfati, J., Prevost, M. C., Henry, C. e Latge, J. P. (2005). Deletion of GEL2 encoding for a beta-(1,3)-glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 56(6): 1675-88.

Muhlschlegel, F. A. e Fonzi, W. A. (1997). PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* 17(10): 5960-7.

Muniz, M., Morsomme, P. e Riezman, H. (2001). Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 104(2): 313-20.

Nakazawa, T., Horiuchi, H., Ohta, A. e Takagi, M. (1998). Isolation and characterization of EPD1, an essential gene for pseudohyphal growth of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *J Bacteriol* 180(8): 2079-86.

Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S. e Beppu, T. (1992). A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol Microbiol* 6(6): 761-9.

Nunes, L. R., Costa de Oliveira, R., Leite, D. B., da Silva, V. S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M. E., Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Goldman, M. H., Puccia, R., Travassos, L. R., Batista, W. L., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G., Yang, D. Y., de Braganca Pereira, C. A. e Goldman, G. H. (2005). Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 4(12): 2115-28.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. e Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79.

Ohkura, H., Adachi, Y., Kinoshita, N., Niwa, O., Toda, T. e Yanagida, M. (1988). Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* dis genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *Embo J* 7(5): 1465-73.

Passos, D. A. C., Báo, S. N., Chagas, R. F., Felipe, M. S. S. e Soares, C. M. A. (2003). Cellular localization of the HSP60 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia*.

Pereira, L. A., Bao, S. N., Barbosa, M. S., da Silva, J. L., Felipe, M. S., de Santana, J. M., Mendes-Giannini, M. J. e de Almeida Soares, C. M. (2007). Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7(8): 1381-8.

Phizicky, E. M. e Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59(1): 94-123.

Pittet, M. e Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771(3): 405-20.

Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R. e Alberghina, L. (1993). Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol* 175(7): 1879-85.

Prado, M., Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R. e Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3): 513-21.

Queiroz-Telles, F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Wndings. **Paracoccidioidomycosis**. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. and Del Negro, G. London, CRC Press**:** 27–44.

Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latge, J. P. e Popolo, L. (2007). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* 24(4): 297-308.

Rain, J. C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. e Legrain, P. (2001). The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* 409(6817): 211-5.

Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H. e Klis, F. M. (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta-1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol* 180(6): 1418-24.

Ram, A. F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. e Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* 10(8): 1019-30.

Ramirez, M. A. e Lorenz, M. C. (2009). The transcription factor homolog CTF1 regulates beta-oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8(10): 1604-14.

Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C. e Hollenstein, G. O. (2003). Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64(2): 339-66.

Ren, X. D., Bokoch, G. M., Traynor-Kaplan, A., Jenkins, G. H., Anderson, R. A. e Schwartz, M. A. (1996). Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa

phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol Biol Cell* 7(3): 435-42.

Restrepo-Moreno, A. (2003). Paracoccidioidomycosis. **Clinical Mycology**. Dismukes, W. E., Pappas, P. G. and Sobel, J. New York, Oxford University Press**:** 328–345.

Restrepo, A., McEwen, J. G. e Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39(3): 233-41.

Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D. e Stevens, D. A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46(2): 346-53.

Reynolds, T. B. e Fink, G. R. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291(5505): 878-81.

Ricci, G., Mota, F. T., Wakamatsu, A., Serafim, R. C., Borra, R. C. e Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 42(4): 379-83.

Richini-Pereira, V. B., Bosco, S. D., Griese, J., Theodoro, R. C., Macoris, S. A., Da Silva, R. J., Barrozo, L., Tavares, P. M., Zancope-Oliveira, R. M. e Bagagli, E. (2007). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*: 1-6.

Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. e Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* 7(1): 58-67.

Rooney, P. J. e Klein, B. S. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* 4(3): 127-37.

San-Blas, G., Nino-Vega, G. e Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40(3): 225-42.

San-Blas, G. e San-Blas, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* 62(2): 77-86.

San-Blas, G. e San-blas, F. (1994). Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. **Paracoccidioidomycosis**. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. and del Negro, G. B. London, CRC Press**:** 49-63.

Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. e Fonzi, W. A. (1995). PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 15(2): 601-13.

Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T. e Hall, M. N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88(4): 531-42.

Schneider, R., Brors, B., Burger, F., Camrath, S. e Weiss, H. (1997). Two genes of the putative mitochondrial fatty acid synthase in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 32(6): 384-8.

Schonauer, M. S., Kastaniotis, A. J., Hiltunen, J. K. e Dieckmann, C. L. (2008). Intersection of RNA processing and the type II fatty acid synthesis pathway in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* 28(21): 6646-57.

Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A. e Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* 114(1): 111-23.

Shematek, E. M. e Cabib, E. (1980). Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation of beta-1,3-glucan synthetase by ATP and GTP. *J Biol Chem* 255(3): 895-902.

Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L. e Moretti, M. L. (2006). [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(3): 297-310.

Silva, M. F., Bocca, A. L., Ferracini, R., Jr., Figueiredo, F. e Silva, C. L. (1997). Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. *Clin Exp Immunol* 109(2): 261-71.

Silva, S. P., Borges-Walmsley, M. I., Pereira, I. S., Soares, C. M., Walmsley, A. R. e Felipe, M. S. (1999). Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol* 31(4): 1039-50.

Snay-Hodge, C. A., Colot, H. V., Goldstein, A. L. e Cole, C. N. (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *Embo J* 17(9): 2663-76.

Steinbach, W. J., Cramer, R. A., Jr., Perfect, B. Z., Henn, C., Nielsen, K., Heitman, J. e Perfect, J. R. (2007). Calcineurin inhibition or mutation enhances cell wall inhibitors against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51(8): 2979-81.

Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R. e Culotta, V. C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276(41): 38084-9.

Takeuchi, M. e Yanagida, M. (1993). A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase dsk1 with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol Biol Cell* 4(3): 247-60.

Tang, Z., Yanagida, M. e Lin, R. J. (1998). Fission yeast mitotic regulator Dsk1 is an SR protein-specific kinase. *J Biol Chem* 273(10): 5963-9.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G. e Felipe, M. S. (2009). Phylogenetic

analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52(2): 273-83.

Teparic, R., Stuparevic, I. e Mrsa, V. (2004). Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* 150(Pt 10): 3145-50.

Terçarioli, G. R., Bagagli, E., Reis, G. M., Theodoro, R. C., Bosco Sde, M., Macoris, S. A. e Richini-Pereira, V. B. (2007). Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 7: 92.

Theodoro, R. C., Candeias, J. M., Araujo, J. P., Jr., Bosco Sde, M., Macoris, S. A., Padula, L. O., Franco, M. e Bagagli, E. (2005). Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* 43(8): 725-9.

Toledo, M. S., Levery, S. B., Straus, A. H., Suzuki, E., Momany, M., Glushka, J., Moulton, J. M. e Takahashi, H. K. (1999). Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (*E*)-Δ^3-unsaturation in cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry* 38(22): 7294-306.

Tolias, K. F., Cantley, L. C. e Carpenter, C. L. (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 270(30): 17656-9.

Tomazett, P. K., Cruz, A. H., Bonfim, S. M., Soares, C. M. e Pereira, M. (2005). The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet Mol Res* 4(2): 309-25.

Tran, E. J., Zhou, Y., Corbett, A. H. e Wente, S. R. (2007). The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. *Mol Cell* 28(5): 850-9.

Tseng, S. S., Weaver, P. L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A. M. e Chang, T. H. (1998). Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly$(A)^+$ RNA export. *Embo J* 17(9): 2651-62.

Urban, C., Xiong, X., Sohn, K., Schroppel, K., Brunner, H. e Rupp, S. (2005). The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 57(5): 1318-41.

Vai, M., Orlandi, I., Cavadini, P., Alberghina, L. e Popolo, L. (1996). *Candida albicans* homologue of *GGP1/GAS1* gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Yeast* 12(4): 361-8.

Valera, E. T., Mori, B. M., Engel, E. E., Costa, I. S., Brandao, D. F., Nogueira-Barbosa, M. H., Queiroz, R. G., Silveira Vda, S., Scrideli, C. A. e Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. *Pediatr Blood Cancer* 50(6): 1284-6.

van den Bogaart, G., Meinema, A. C., Krasnikov, V., Veenhoff, L. M. e Poolman, B. (2009). Nuclear transport factor directs localization of protein synthesis during mitosis. *Nat Cell Biol* 11(3): 350-6.

Vancurova, I., Choi, J. H., Lin, H., Kuret, J. e Vancura, A. (1999). Regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase from *Schizosaccharomyces pombe* by casein kinase I. *J Biol Chem* 274(2): 1147-55.

Villar, L. A., Salazar, M. E. e Restrepo, A. (1988). Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol* 26(5): 269-76.

Vossen, J. H., Muller, W. H., Lipke, P. N. e Klis, F. M. (1997). Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J Bacteriol* 179(7): 2202-9.

Walter, S. e Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41(7): 1098-113.

Winters, M. S., Spellman, D. S., Chan, Q., Gomez, F. J., Hernandez, M., Catron, B., Smulian, A. G., Neubert, T. A. e Deepe, G. S., Jr. (2008). *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron availability. *Proteome Sci* 6: 36.

Xiao, S. H. e Manley, J. L. (1997). Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* 11(3): 334-44.

Yin, Q. Y., de Groot, P. W., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M. e de Koster, C. G. (2005). Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* 280(21): 20894-901.

Zhang, Y., Sugiura, R., Lu, Y., Asami, M., Maeda, T., Itoh, T., Takenawa, T., Shuntoh, H. e Kuno, T. (2000). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. *J Biol Chem* 275(45): 35600-6.

Zügel, U. e Kaufmann, S. H. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 12(1): 19-39.

Anexos

10 – ANEXOS

10.1 - Apresentação do trabalho em congressos

SILVA, M. G.; BAILAO, E. F. L. C.; PARENTE, J. A.; BAILAO, A. M.; BORGES, C. L.; SALEM-IZACC, S. M.; SOARES, C. M. A. Analysis of protein interactions in *Paracoccidioides brasiliensis* using a two-hybrid system. 26ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos, 2008, Salvador – BA.

SILVA, M. G.; BAILAO, E. F. L. C.; PARENTE, J. A.; BAILAO, A. M.; BORGES, C. L.; SALEM-IZACC, S. M.; SOARES, C. M. A. Estudo das interações moleculares da glicanosiltransferase 3 de *Paracoccidioides brasilienis*. IV Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, 2009, Goiânia – GO.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo